

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

# Charakterisierung des $\mu$ -Slides zur Analyse von Chemotaxis: Ein Vergleich zur Boyden-Kammer

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Anna-Chi Schreyer

aus  
München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. O. Gires
	<hr/>
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Barbara Walzog Prof. Dr. Christian Sommerhoff
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. P. Zengel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	09.10.2014

*für meine Mama und  
meinen Bruder*

# PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Doktorarbeit war es mir möglich zu folgender Publikation beizutragen:

Zengel P, **Nguyen-Hoang A**, Schildhammer C, Zantl R, Valentin K, Horn E (2011)  $\mu$ -Slide Chemotaxis: A new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biology*; 12(1):21

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
1.1 Definition der Chemotaxis.....	7
1.2 Entwicklung von in-vitro-Systemen zur Messung von Chemotaxis.....	7
1.3 Boyden-Kammer.....	10
1.4 Zigmond-Kammer.....	11
1.5 $\mu$ -Slide Chemotaxis.....	13
1.6 Zielsetzung.....	13
<b>2 MATERIAL.....</b>	<b>15</b>
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte.....	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3 Geräte.....	16
2.2 Zelllinien.....	16
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>17</b>
3.1 Zellkultur.....	17
3.1.1 Zellkulturbedingungen: Kultivierung und Aufbewahrung permanenter Zelllinien.....	17
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	18
3.2 Migrationsversuche.....	18
3.2.1 Boyden-Kammer.....	18
3.2.1.1 Versuchsaufbau und -durchführung.....	19
3.2.1.2 Auswertung.....	20
3.2.2 $\mu$ -Slide Chemotaxis.....	21
3.2.2.1 $\mu$ -Slide Chemotaxis Standardprotokoll.....	22
3.2.2.2 Mikroskopie und Lebendzellabbildung.....	24

3.2.2.3	Auswertung und Datenanalyse.....	25
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>
4.1	Zellmigration in der Boyden-Kammer.....	30
4.1.1	Einfluss von FCS auf die Migration von HT-1080 Zellen.....	30
4.1.2	Einfluss von konditioniertem FaDu-Überstand auf die Migration von HUVEC.....	33
4.2	Migrationsverhalten im $\mu$ -Slide.....	34
4.2.1	Direkte Migration von HT-1080 Zellen auf ein Gradient aus FCS.....	35
4.2.2	Direkte Migration von HUVEC im $\mu$ -Slide.....	40
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>43</b>
5.1	Bewertung der Ergebnisse.....	44
5.1.1	Chemotaxis in der Boyden-Kammer.....	44
5.1.2	Chemotaxis im $\mu$ -Slide.....	45
5.1.3	Boydenkammer- und $\mu$ -Slide-Ergebnisse im Vergleich..	49
5.2	Vor- und Nachteile beider Systeme.....	51
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>59</b>

# 1 EINLEITUNG

Heute ist bekannt, dass Chemotaxis, *i.e.* die zielgerichtete Zellmigration auf einen Lockstoff, in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen wie Infektionsbekämpfung, Angiogenese, Tumorwachstum und -metastasierung eine zentrale Rolle spielt (Zeller, Skalak et al. 2001, Olson and Ley 2002, Navenot, Fujii et al. 2009).

Beispielsweise wird Neoangiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, über die Produktion chemotaktischer Faktoren gesteuert. Wachstumsfaktoren wie z. B. vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) bewirken über Endothelproliferation und -migration die Bildung neuer Blutgefäße (Reinmuth, Parikh et al. 2003). Neovaskularisation ist ausschlaggebend für Tumorwachstum und Metastasierung (Folkman 1986). *In vivo* Beobachtungen haben gezeigt, dass schnelles Wachstum eines Tumors erst dann stattfinden kann, sobald Neovaskularisation eintritt. Tumore, die eine Größe von  $1,5 \text{ mm}^3$  überschreiten, können Nährstoffe nicht mehr ausschließlich über Diffusion aufnehmen, sondern bedürfen einer eigenen Blutversorgung (Folkman 1990, Fidler and Ellis 1994). Darüber hinaus ermöglicht die Blutversorgung Tumorzellen in die Blutbahn einzutreten, zu zirkulieren und, nach einer Extravasation in ein lokoregionales oder fernes Gewebe, Metastasen zu bilden (Ratajczak, Lewis et al. 1986).

Gleichermaßen spielt Chemotaxis bei der Akkumulierung von Leukozyten am Entzündungsort im Rahmen einer Immunantwort eine entscheidende Rolle. Die Migration von Leukozyten wird über eine Vielzahl von Lockstoffen, die am Infektionsort ausgeschüttet werden, reguliert. Während eine kontrollierte Ansammlung von Leukozyten am Entzündungsherd durchaus erwünscht wird, führt eine überschießende Rekrutierung dieser Zellen zu Gewebszerstörung und chronisch entzündlichen Krankheiten (Norman and Kubes 2005).

Dem zu Folge wird der Chemotaxis bei der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Bekämpfung maligner Tumore oder chronisch entzündlicher Erkrankungen eine große Bedeutung zugeschrieben. Die Suche nach einem geeigneten

Testverfahren zur detaillierten Beobachtung chemotaktisch aktiver Zellen geht bis ins 19. Jahrhundert zurück. Derzeit gilt die Boyden-Kammer als Goldstandard für die Messung der Chemotaxis *in vitro*. Dennoch weist diese Methode Nachteile auf, was die Suche nach einem neuen Verfahren erfordert.

## **1.1 Definition der Chemotaxis**

Chemotaxis bezeichnet das gerichtete Wandern von Lebewesen oder Zellen in Abhängigkeit eines Konzentrationsgradienten. Dabei lassen sich zwei Arten von Chemotaxis unterscheiden. Geht die Bewegung Richtung stimulierende Substanz spricht man von positiver Chemotaxis und die betreffende Substanz wird Lockstoff oder Attraktans genannt. Ist die Bewegung des Organismus oder der Zelle auf Grund des Attraktans in die entgegengesetzte Richtung gerichtet, spricht man von negativer Chemotaxis und nennt die betreffende Substanz Schreckstoff oder Repellent. Chemokinese hingegen beschreibt eine ungerichtete, zufällige Bewegung der Zelle, als Antwort auf eine Substanz (Becker 1977).

## **1.2 Entwicklung von in-vitro-Systemen zur Messung von Chemotaxis**

Lange bevor der Terminus „Chemotaxis“ überhaupt zur Beschreibung gerichteter Zellwanderung verwendet wurde, gab es bereits Beobachtungen, dass bestimmte chemische Substanzen Leukozyten anlocken. Es war Theodor Leber, der sich als erster 1888 dem Begriff „Chemotaxis“ in Bezug auf Leukozyten, die einem Konzentrationsgradienten folgten, bediente. Lebers Experimente bestanden darin bestimmte Testsubstanzen in die Vorderkammer von Kaninchenaugen zu injizieren. Dabei beobachtete er eine Ansammlung von



Leukozyten am Injektionsort (Leber 1888). Seitdem wurde eine Vielzahl an Methoden entwickelt um Chemotaxis *in vivo* und *in vitro* zu messen.

Leber injizierte verschiedene Testsubstanzen nicht nur direkt in die Kaninchenaugen, sondern bediente sich auch kleiner mit Testsubstanz gefüllten Kapillarröhrchen, die er in die Vorderkammer von Kaninchenaugen einbrachte, um so die chemotaktische Wirkung der Substanzen auf Leukozyten zu testen (Leber 1891). Anschließend wurden die Kapillarröhrchen wieder entfernt, der Inhalt ausgedrückt, und die Leukozytenzahlen untereinander verglichen. Diese Methode war allerdings mit einigen Fehlern behaftet. Es zeigte sich, dass die Leukozyten nicht nur durch amoeboiden Bewegungen in die Röhrchen migrierten, sondern auch einfach nur aufgrund osmotischer Druckunterschiede zwischen Röhrchen und umgebendem Gewebe eingeschwemmt wurden. Unter diesen Umständen wurden neben Leukozyten auch Erythrozyten in den Röhrchen gefunden, die offensichtlich nur passiv in die Röhrchen gelangten (Pfoehl 1898, Ruchlädew 1910).

Auf Grund dieser Fehlerquellen der Methode nach Leber wurde nach einer Methode gesucht, die Leukozyten daran hindern sollte passiv aufgrund osmotischer Druckunterschiede zur Testsubstanz zu migrieren und es erlaubt ihre aktiven Bewegungen zu dokumentieren. Clark *et al.* injizierten Testsubstanzen wie Stärke oder Krotonöl in transparente Kaulquappenschwänze und konnten so unter dem Mikroskop amoeboiden Bewegungen von Leukozyten in Richtung Lockstoff beobachten (Clark and Clark 1920, Clark and Clark 1922). Aber auch diese Methode zeigte gewisse Nachteile. Bereits die kleinste Irritation, sogar die Injektion selbst, führte zu verstärkter Zellmigration, so dass der eigentliche Beitrag von Testsubstanzen nur schwer nachvollziehbar war.

Comandon war der Erste, der *in vitro* Beobachtungen von Zellmigration durchführte (Comandon 1917). Dabei beobachtete er Leukozyten, die sich in einem Blutstropfen zwischen einem Deckglas und einem Objektträger befanden, unter dem Mikroskop und dokumentierte deren Fortbewegungsrichtung auf eine bestimmte Testsubstanz zu. So beobachtete er Leukozyten, die sich Malaria-infizierten Erythrozyten annäherten (Comandon 1917). Diese Deckglas-Objektträger-Methode eignete sich gut um chemotaktische Effekte von einzelnen Partikeln wie Bakterien zu testen. Der Vorteil dieser Methode lag in der

Möglichkeit einzelne Leukozyten unter dem Mikroskop direkt beobachten zu können (Grimes and Barnes 1973).

Bis zu diesem Zeitpunkt wiesen alle Testverfahren ein gemeinsames Defizit auf. Es ließ sich bei keiner der genannten Methoden eine Aussage über den Konzentrationsgradienten des Lockstoffes treffen.

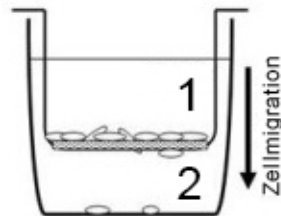
1974 beschrieben Cutler *et al.* die Agarose-Methode (Cutler and Munoz 1974). Die Methode bestand aus einem Deckglas, welches mit einer Agarosegelschicht benetzt wurde. Anschließend wurden drei runde Vertiefungen in einer Reihe und in gleichen Abständen zueinander gestanzt. Die mittige Vertiefung wurde mit Zellen, die verbliebenen Vertiefungen mit einer Lockstoff- oder Kontrollsubstanz versehen. Über Diffusion des Chemoattraktans und der Kontrolllösung durch das Gel entstand nun ein exponentieller Konzentrationsgradient, welcher die Zellen dazu veranlasste durch die Agarose Richtung Lockstoff zu wandern (Foxman, Campbell et al. 1997). Nach einer definierten Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert, die Agarose entfernt und das Deckglas gefärbt. Die Auswertung erfolgte über die Messung der Distanz, welche die Zellen Richtung Lockstoff oder Kontrolllösung zurückgelegt hatten. Dabei konnte entweder der Chemotaxisindex, welcher sich als Verhältnis der zurückgelegten Distanz zum Lockstoff und zum Kontrollstoff errechnete, oder die Chemotaxisdifferenz ermittelt werden, welche man aus der Distanz zum Lockstoff nach Abzug der Distanz zum Kontrollstoff erhielt (Chenoweth, Rowe et al. 1979).

1979 entwarfen Gundersen *et al.* die Mikropipetten-Methode, die sich gut zur Beobachtung und Charakterisierung einzelner Zellantworten eignete. Gundersen und Kollegen brachten eine Lockstoff-enthaltende Mikropipette in einem 45° - Winkel und einer Entfernung von 25 µm von der Longitudinalachse eines Neuroaxons an und beobachtete die Zellbewegung unter einem Mikroskop (Gundersen and Barrett 1979). Aber auch hier lag der große Nachteil in der Instabilität des Gradienten, welcher schon aufgrund geringer Vibrationen, Temperaturunterschiede oder sogar Formabweichungen der Mikropipettenspitzen variierte.

## 1.3 Boyden-Kammer

Eines der meist genutzten Systeme für Chemotaxisversuche in der Zellbiologie heute und zugleich Pionier einer andauernden Entwicklung sogenannter 2-Kammer-Systeme, war die von Steve Boyden entwickelte Boyden-Kammer (Boyden 1962).

Die Boyden-Kammer ist ein Zellkulturgefäß, das aus zwei Kompartimenten besteht, welche wiederum durch eine mit definierten Mikroporen (Größe von 5 bis 10  $\mu\text{m}$ ) durchsetzte Membran getrennt werden. Zu Beginn wird eine Lockstoff-enhaltende Lösung in das untere Kompartiment pipettiert. Das obere Kompartiment, dessen Boden eine porige Membran darstellt, wird mit Zellen versehen und in die untere Kammer gesetzt. Dabei kann nun die chemotaktische Lösung durch die Membran in die obere Kammer diffundieren und erzeugt so einen Konzentrationsgradienten, der die Zellen der oberen Kammer dazu bringt durch die Poren der Membran zu migrieren. Nach einer definierten Inkubationszeit werden die Zellen, die auf die Unterseite der Membran migriert sind, fixiert, gefärbt und gezählt.



**Abbildung 1.1 Schematische Darstellung einer Boyden-Kammer** im Querschnitt mit (1) oberem und (2) unterem Kompartiment. Zellmigration findet von oben nach unten statt (Gostner, Fong et al. 2011).

Die Boyden-Kammer, in moderner Form auch als Transwell-Assay bezeichnet, wurde anschließend von vielen Forschern modifiziert (Ward, Cochrane et al. 1965, Cornely 1966, Keller and Sorkin 1968, Tempel, Snyderman et al. 1970, Wilkinson 1974, Jungi 1975, Campbell 1977, Valerius 1978, Falk, Goodwin et al. 1980). Die Modifikationen betrafen sowohl die Kammer als auch die Membran. Kammern unterschiedlicher Volumina oder im Multiwell-Format mit Filter-Inserts

sowie verschieden beschichtete Membranen (Zellulose/Nitrate oder Polycarbonate) unterschiedlicher Dicke wurden getestet.

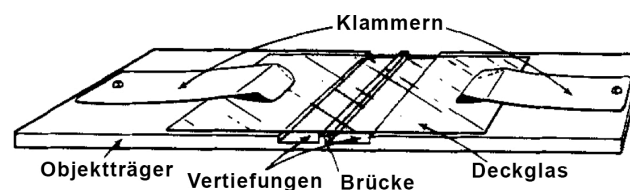
Die einfache Handhabung und die Bereitstellung eines quantitativen Maßes für chemotaktisch induzierte Zellmigration haben die Boyden-Kammer zum Goldstandard für Chemotaxisversuche in der Zellbiologie gemacht. Hingegen ihrer Beliebtheit weist die Boyden-Kammer einige Nachteile auf, die unter anderem in dieser Arbeit diskutiert werden sollen.

Eine Weiterentwicklung der Boyden-Kammer und zugleich der Grundstein des neu entwickelten Chemotaxis-Assays stellt die Zigmond-Kammer dar.

## 1.4 Zigmond-Kammer

Sally Zigmond entwickelte 1977 ein System, das erstmals eine direkte Beobachtung von Zellen während der Migration in Abhängigkeit gut definierter Gradienten zuließ (Zigmond 1977).

Die Kammer besteht aus einem Plexiglas-Objektträger, welcher mit zwei parallel angebrachten Vertiefungen versehen ist. Die beiden Kanäle werden durch eine „Brücke“ getrennt, welche 3-10  $\mu\text{m}$  unter der Oberfläche des Objektträgers liegt. Ein mit Zellen versehenes Deckglas wird kopfstehend auf die Kanäle gelegt und bildet so eine 3-10  $\mu\text{m}$  hohe und 1 mm breite Lücke zwischen dem Deckglas und der Brücke. Das Deckglas wird über 2 Klammern, welche jeweils an den Enden des Objektträgers befestigt sind, gehalten. Füllt man nun die beiden Kanäle mit Medien unterschiedlicher Konzentration wird durch Diffusion ein linearer Gradient über der Brücke erzeugt (Crank 1964, Cussler 1997).



**Abbildung 1.2** Schematische Darstellung einer Zigmond-Kammer (Zigmond 1977).

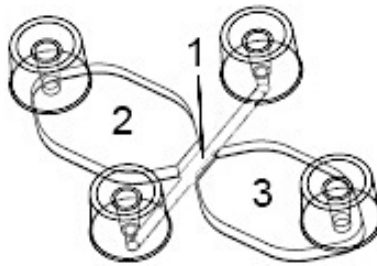
Veränderungen von Wachstum, Differenzierung oder Migration individueller Zellen können mit Hilfe eines Mikroskops über dem Brückenbereich direkt beobachtet werden. Im Gegensatz zu bisherigen Chemotaxis-Assays können in der Zigmond-Kammer reproduzierbare und mathematisch berechenbare Gradienten erzeugt werden. Allerdings ist die Dauer dieses Fließgleichgewichtes aufgrund der endlichen Volumina und gewisser Volumenverluste durch Verdunstung auf ca. 60-90 Minuten begrenzt (Zigmond 1977). Mit einer Dicke von über 3 mm und der Anfertigung aus Polymethylmethacrylat (PMMA) ist die Zigmond-Kammer nicht für die inverse Mikroskopie geeignet, so dass Videomikroskopie, welche gewöhnlich mit inversen Mikroskopen durchgeführt wird, nicht angewendet werden kann.

Nach dem gleichen Prinzip, aber mit unterschiedlicher Geometrie, funktioniert die Dunn-Kammer (Zicha, Dunn et al. 1997). Die zwei Vertiefungen der Dunn-Kammer sind im Gegensatz zur Zigmond-Kammer konzentrisch. Die „Brücke“, welche die Vertiefungen voneinander trennt, dementsprechend ringförmig. Auch hier werden die Vertiefungen mit Chemoattraktans gefüllt sowie ein mit Zellen versehenes Deckglas aufgelegt. Die Lockstoffe diffundieren zwischen den Vertiefungen und erzeugen so einen stabilen Gradienten über der Brücke. Das Prinzip zur Erzeugung des Gradienten gleicht demnach dem der Zigmond-Kammer. Der wesentliche Unterschied liegt in der Brückenregion, welche bei der Zigmond-Kammer einen dünnen Film, bei der Dunn-Kammer eher eine zylindrische „Mauer“ darstellt. Im Vergleich zur Zigmond-Kammer verfügt die Dunn-Kammer über eine präzisere und komplett abgeschlossene Konstruktion, welche einen stabileren Gradienten ermöglicht (Zicha, Dunn et al. 1997). Hinzu kommt, dass die Dunn-Kammer, im Gegensatz zu der aus 3 mm dickem Plexiglas angefertigten Zigmond-Kammer, komplett aus 1 mm dickem Glas hergestellt ist, so dass sie auch für andere lichtmikroskopische Verfahren wie die inverse Mikroskopie, geeignet ist (Zicha, Dunn et al. 1991).

Durch den zweiteiligen Aufbau beider Kammern kann es allerdings durch das Aufbringen des Deckglases bei unvorsichtiger Handhabung zu einer Durchmischung der Lösungen, welche wiederum maßgeblich für einen stabilen Gradienten sind, kommen.

## 1.5 $\mu$ -Slide Chemotaxis

Das  $\mu$ -Slide Chemotaxis ist eine Chemotaxis-Kammer, welche auf dem Prinzip der Zigmond-Kammer basiert. Anders als die Zigmond-Kammer besteht das  $\mu$ -Slide aus einem Stück und wurde für inverse Mikroskope entworfen. Das  $\mu$ -Slide besteht aus zwei Reservoiren, die in der Mitte über einen „Beobachtungskanal“ verbunden sind. Durch Füllen der Reservoirs mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Lockstoffes wird über Diffusion ein bis zu 48 Stunden linearer sowie stabiler Gradient über dem Beobachtungskanal aufgebaut. Die im Kanal befindlichen Zellen sind zwei entgegengesetzten Gradienten ausgesetzt. Über Videomikroskopie ist die genaue Verfolgung und Analyse einzelner Zellbewegungen möglich.



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung eines  $\mu$ -Slides Chemotaxis mit einem (1) Beobachtungskanal und zwei (2,3) Reservoiren.**

## 1.6 Zielsetzung

Seit der Erkenntnis, dass Chemotaxis in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt, ist es zu einem erstrebenswerten Ziel geworden, Chemotaxis zu quantifizieren. Chemotaxis darstellende Testverfahren sollen zur Entschlüsselung biologischer Vorgänge sowie bei der Entwicklung neuer Therapieansätze helfen. Die wohl derzeit meist genutzte Methode um Zellmigration zu quantifizieren ist die Boyden-

Kammer. Doch selbst diese weit verbreitete und gut etablierte Methode weist Nachteile auf, die im Rahmen dieser Arbeit diskutiert werden sollen.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist eine Gegenüberstellung des bisherigen Goldstandards für Chemotaxisversuche, der Boyden-Kammer, und des neuen  $\mu$ -Slides Chemotaxis. Hierfür sollen Chemotaxisversuche mit den Zelllinien HUVEC und HT-1080 in der Boyden-Kammer durchgeführt und mit HUVEC-Versuchen im  $\mu$ -Slide sowie einem bestehenden Datensatz mit HT-1080 Zellen einer gemeinsamen Arbeitsgruppe verglichen werden. Im Anschluss sollen Ergebnisse und Durchführbarkeit nebeneinander gestellt sowie Vor- und Nachteile beider Systeme herausgearbeitet werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien**

Artikel	Firma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
DMSO	Merck, Darmstadt
Eosin	Chroma-Gesellschaft, Köntgen/N.
Endothel Cell Growth Medium (ECGM)	Promocell GmbH, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glyzerol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Mayer's Hämalun Lösung	Merck, Darmstadt
Phosphat buffered saline (PBS-) Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
Penicillin, Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	Biochrom AG, Berlin

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Artikel	Bezugsquelle
Kanülen	BD, Heidelberg
Kryogefäße	Nunc, Wiesbaden
Migrationskammern (Chemotaxis $\mu$ -slide)	Ibidi, Martinsried
Objektträger „Superfrost“	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen (gestopft)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falkon/BD Le Pont de Claix (F)
Skalpelle	Feather/PFM, Köln



Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Inserts (8,0 µm)	Falkon/BD, Heidelberg
Zellkultur-Multiloch-Platten (12 Well)	Falkon/BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugegefäße 1,5 / 2ml	Eppendorf, Hamburg

## 2.1.3 Geräte

**Tabelle 2.3 Verwendete Geräte**

Artikel	Bezugsquelle
CCD-Kamera	Orca, Hamamatsu, Japan
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“	Carl Zeiss, Jena
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Glaswaren Schott	Roth, Karlsruhe
Heiz- und Inkubationssystem (37°C)	Ibidi GmbH, Martinsried
Inverses Mikroskop Eclipse Ti	Nikon, Düsseldorf
Inkubator für Zellkultur, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus, München
Konfokales Laserscan Mikroskop (KLSM)	Carls Zeiss, Jena
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroliter-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Mikrowelle	AEG, Berlin
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Zeiss, Halbergmoss
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Zelllinien

**Tabelle 2.4 Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Herkunft	Referenz
FaDu	Hypopharynx-Karzinomzelllinie	ATCC HTB-43
HT-1080	Fibrosarkomzelllinie	ATCC CCL-121
HUVEC	Primäre Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur (Human umbilical vein endothelial cells)	Lonza, Verviers, Belgien

ATCC: American Tissue Culture Collection

## 3 METHODEN

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Zellkulturbedingungen: Kultivierung und Aufbewahrung permanenter Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Standardmedium für FaDu- und HT-1080 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10% Fetal Calf Serum (FCS) und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin) benutzt. Für HUVEC-Zellen wurde Endothel Cell Growth Medium (ECGM) verwendet. Adhärente FaDu- und HT-1080 Zellen wurden alle 2-3 Tage, HUVEC alle 10 Tage zur Subkultivierung zunächst mit 10 ml PBS serumfrei gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA von der Kulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde 1:10 mit frischem Medium verdünnt oder für weitere Versuche in gewünschter Dichte ausplattiert. Alle nötigen Zentrifugationsschritte wurden bei 280 Umdrehungen/min für 5 min bei 20°C durchgeführt. Für alle Experimente wurden nur die ersten drei Passagen isolierter HUVEC verwendet.

Zur Aufbewahrung der Zelllinien wurden jeweils  $10^6$ - $10^7$  Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Diese Suspension wurde in ein 1,8 ml Kryogefäß überführt und in einem verschließbaren Styroporbehälter in einem -80°C Gefrierschrank langsam eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagertank überführt.

Zur Rekultivierung eingefrorener Zellen wurde der Inhalt eines Kryogefäßes durch Resuspension mit frischem Kulturmedium zügig aufgetaut. Die Zellen wurden einmal zentrifugiert und anschließend zur Kultivierung mit frischem Medium verdünnt in eine Kulturflasche gegeben.

### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlen wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Fuchs-Rosenthal-Kammer hat eine Zählfläche von 4 x 4 Quadraten mit einer Kantenlänge von jeweils 1 mm und eine Kammertiefe von 0,2 mm. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen 1:1 mit einer 0,2%-igen Trypanblaulösung gemischt. Während tote Zellen den blauen Farbstoff aufnehmen, bleiben lebende Zellen farblos. Anschließend wurden 20 µl des Zellen-Trypanblau-Gemischs in die Zählkammer gegeben und die Zellen in 4 Quadranten unter dem Mikroskop ausgezählt. Die gesamte Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned}\text{Zellen pro 1 ml} &= \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche} \times \text{Kammertiefe} \times \text{Verdünnung}} = \\ &= \text{ausgezählte Zellzahl} \times 10^4 \times 2\end{aligned}$$

Für µ-Slide Versuche wurde eine Zellkonzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml, für Versuche in der Boyden-Kammer eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml gewählt.

## 3.2 Migrationsversuche

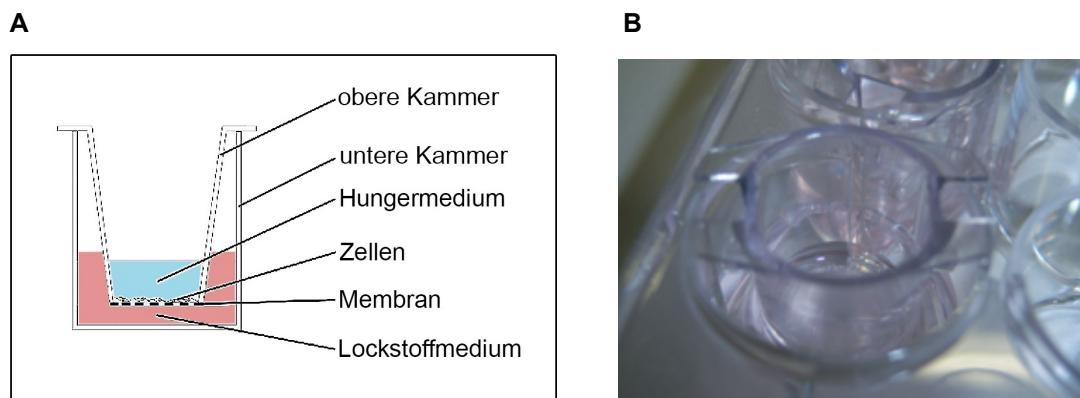
### 3.2.1 Boyden-Kammer

Die Boyden-Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, welche durch eine porige Membran getrennt werden. Das obere Kompartiment ist mit Zellen und einer Referenzlösung, das untere Kompartiment mit der zu untersuchenden Lockstofflösung gefüllt. Die Zellen können dabei nur durch aktive Migration durch

die Poren auf die Unterseite der Membran gelangen. Die Auswertung erfolgt rein quantitativ über die Ermittlung der Zellzahl auf der Unterseite der Membran.

### 3.2.1.1 Versuchsaufbau und -durchführung

Zur Bestimmung der chemotaktischen Wirkung eines Stoffes auf eine bestimmte Zellpopulation wurden Boyden-Kammern im 12 Well Format mit Zellkultur-Inserts mit einer Porengröße von  $8,0\text{ }\mu\text{m}$  verwendet. Hierfür wurden die Kammern für die einzelnen Versuche mit einer Pinzette aus der Verpackung entnommen und in eine 12-Loch-Platte überführt. Der dadurch entstandene Raum zwischen dem Zellkultur-Insert und der Loch-Platte bildet dabei das untere Kompartiment, welches zuvor mit einem Lockstoff befüllt wird. Das Insert, dessen Boden aus einer porigen Membran besteht, bildet das obere Kompartiment.



**Abbildung 3.1 Darstellung einer Boyden-Kammer.** (A) Schematische Darstellung einer Boyden-Kammer im Querschnitt. (B) Fotografie eines Zellkultur-Inserts, eingehängt in eine 12-Well-Platte.

Die porendurchsetzte Membran ermöglicht den Aufbau eines Konzentrationsgradienten in die eine, sowie eine Zellmigration in die andere Richtung. Zu Beginn wurde in die obere Kammer  $0,5\text{ ml}$  einer  $2 \times 10^5$  Zellen/ml Zellsuspension (HUVEC oder HT-1080), welche in Hungermedium (DMEM ohne FCS) resuspendiert wurden, pipettiert. Als Lockstoffmedium in der unteren Kammer wurde eine 10%-ige FCS-Lösung verwendet. Der Versuchsaufbau mit der HT-1080 Zelllinie bestand aus einer Lockstoffmessung, auch bezeichnet als (+/-), bei der in die untere Kammer  $1,5\text{ ml}$  der Lockstofflösung (DMEM + 10% FCS) gegeben wurde, sowie zwei Referenzmessungen; eine Negativkontrolle

(-/-), bestehend aus zwei mit Hungermedium gefüllten Kammern, sowie eine Positivkontrolle (+/+), deren Kammern beide Vollmedium (DMEM + 10% FCS) enthielten. Bei der Versuchsreihe mit HUVEC wurde statt der Positivkontrolle (+/+) eine weitere Lockstoffmessung mit 1,5 ml Überstand gehungerter FaDu-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden FaDu-Zellen über 24 h in Hungermedium kultiviert. Anschließend wurde die 12-Well-Platte mit den Boyden-Kammern mit dem zugehörigen Deckel verschlossen und ab dem Zeitpunkt des Befüllens 6 h im Brutschrank inkubiert.

Nach 6 h Inkubationszeit wurden die Membranen der Boyden-Kammern einer Färbeprozedur unterzogen. Hierfür wurden die Kammern nacheinander einzeln mit einer Pinzette aus der Loch-Platte genommen und die Membranen vorsichtig oben und unten mit PBS abgewaschen. Unter dem Mikroskop wurde die Oberseite der Membran betrachtet. Befanden sich auf der Oberseite der Membran Zellen, wurden diese vorsichtig mit einem Wattestäbchen abgestreift. Anschließend wurden die Zellen 2 Minuten in 10%-igem Methanol fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden 10-15 Minuten mit Trypanblau gefärbt und anschließend die überschüssige Farbe mit Wasser weggespült. Die Membranen wurden mit einem Skalpell aus ihrer Halterung herausgeschnitten und auf einem Objektträger in Kaisers Glyzerine fixiert. Die so entstandenen Präparate konnten dann unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

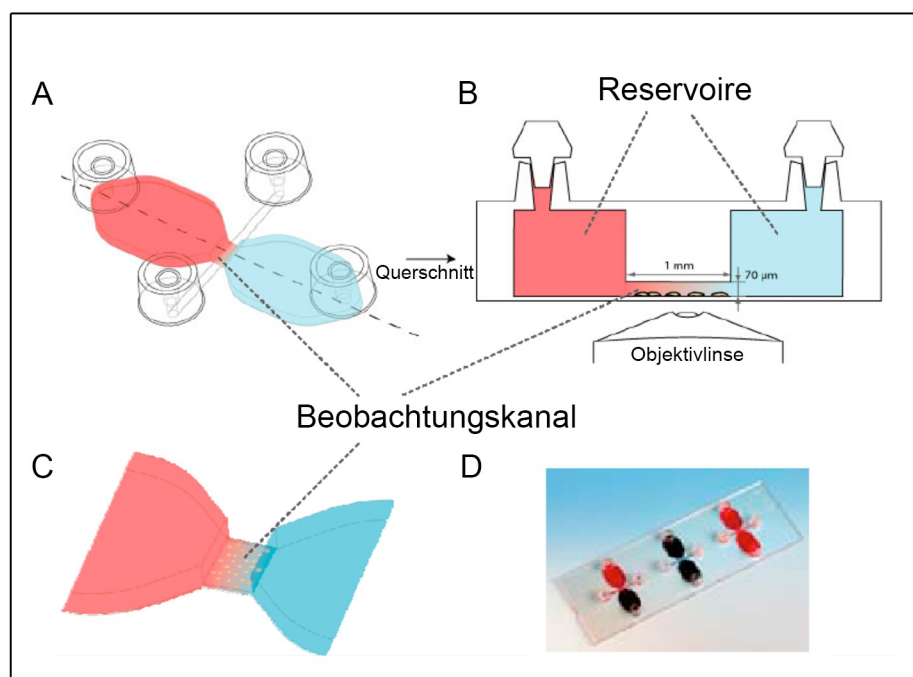
### **3.2.1.2 Auswertung**

Die Auswertung migrierter Zellen erfolgte über ein Auszählen der fixierten Zellen einer Membran. Hierfür wurde die Membran fotografiert und eine Tiff/JPEG Datei in das Programm Image J importiert. Mit Hilfe der Funktion „Point selections“ konnten die Zellen per Mausklick gezählt und markiert werden. So konnten Mehrfachzählungen einzelner Zelle vermieden werden. Da es häufig beim Herausschneiden der Membran aus ihrer Halterung zu Einrissen der Randpartie kam wurden die Zellen im Randbereich von der Zählung ausgeschlossen. Bei gleichmäßiger Zellverteilung auf der Membran wurde über die „Angle-Tool“ Funktion des Programms Image J die Membran in 90°-Kreisektoren geviertelt und die Zellen eines Sektors gezählt. Das ausgezählte Ergebnis eines Kreissektors wurde auf den ganzen Kreis (360°) hochgerechnet. Waren die

Zellen auf der Membran nicht gleichmäßig verteilt, wurde die gesamte Membran ausgezählt.

### 3.2.2 $\mu$ -Slide Chemotaxis

Das  $\mu$ -Slide Chemotaxis der Firma Ibidi ist ein speziell für Untersuchungen der Chemotaxis entwickeltes Kammersystem. Das Slide hat die Größe eines Objektträgers und besteht aus Deckglas-ähnlichem und biokompatiblen Kunststoff. Aufgrund der glasähnlichen Autofluoreszenz, den Transmissionseigenschaften, und einem Brechungsindex von  $n=1,5$  ist die Kammer auch für inverse Mikroskopie geeignet. Der Aufbau des Systems ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.



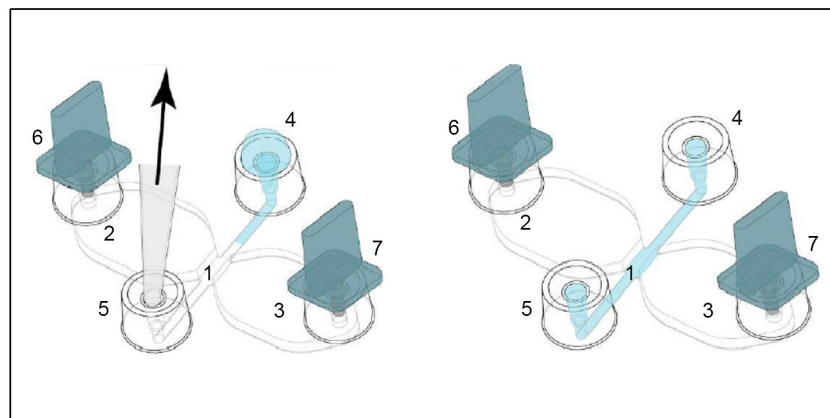
**Abbildung 3.2 Schematische Darstellung des  $\mu$ -Slides von Ibidi.** (A) 3D-Ansicht der Kammer. Der kleine Beobachtungskanal im Zentrum verbindet die beiden großen Reservoirs. (B) Querschnitt eines  $\mu$ -Slides. Die adhären Zellen im Beobachtungskanal werden von einer Seite einem Lockstoff ausgesetzt. (C) Vergrößerung des Beobachtungskanals. (D) Fotografie eines  $\mu$ -Slides Chemotaxis mit drei Chemotaxis-Kammern, welche mit Lebensmittelfarbe gefüllt sind [Ibidi GmbH, 2010].

Auf einem  $\mu$ -Slide befinden sich drei Kammern. Eine Kammer besteht aus zwei 0,8 mm hohen Reservoirs, die durch einen 1 mm breiten, 2 mm langen und 70

$\mu\text{m}$  hohen Beobachtungskanal verbunden werden. Das Fassungsvermögen des Kanals beträgt  $6\ \mu\text{l}$ , das der beiden Reservoirs jeweils  $40\ \mu\text{l}$ . Über angrenzende Einfüllkamine können die Reservoirs sowie der Beobachtungskanal mit unterschiedlichen Substanzen bzw. mit den zu untersuchenden Zellen befüllt werden.

### 3.2.2.1 $\mu$ -Slide Chemotaxis Standardprotokoll

Zellmedien,  $\mu$ -Slide und die dazugehörigen Stöpsel wurden am Vortag des Experimentes zur Gas Equilibrierung in einen Brutschrank mit einer Atmosphäre von  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%\ \text{CO}_2$  gestellt. Zellmediengefäße wurden dazu leicht geöffnet. Als erstes wurde der Beobachtungskanal befüllt. Dafür wurde eine Zellsuspension (HUVEC oder HT-1080 Zellen) mit Nährmedium (ECGM oder DMEM +  $10\%\ \text{FCS}$ ) von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml benötigt. Zunächst wurden bei allen drei Systemen des  $\mu$ -Slides die beiden Reservoir-Kamine (6, 7 Abbildung 3.4) mit den zugehörigen Stöpseln verschlossen. Nun wurde mit einer  $20\ \mu\text{l}$ -Kolbenhubpipette ein  $6\ \mu\text{l}$ -Tropfen der Zellsuspension auf den einen Kamin (4) des Beobachtungskanals gesetzt und anschließend vom gegenüberliegenden Kamin (5) des Kanals her vorsichtig angesaugt.



**Abbildung 3.3 Schematische Darstellung einer  $\mu$ -Slide-Kammer beim Befüllen des Beobachtungskanals.** Kammer mit Beobachtungskanal (1), Reservoirs (2,3), kleine Seitenkanäle mit zugehörigen Kaminen für die Zellaussaat (4,5), und Kamine für die Reservoirs (6,7). Zum Befüllen des Beobachtungskanals wird ein  $6\ \mu\text{l}$ -Tropfen einer Zellsuspension auf Kamin 4 pipettiert und langsam über Kamin 5 angesaugt.

Zur Adhäsion der Zellen wurde das  $\mu$ -Slide nun für 4 h in einen Brutschrank gestellt. Für Chemotaxis-Versuche wurde anschließend das Nährmedium im Kanal gegen Hungermedium mit der gleichen 6  $\mu$ l-Tropfen-Ansaugmethode wie beim Erstbefüllen des Kanals ausgetauscht. Im nächsten Schritt wurden die Reservoirs befüllt. Dazu wurde ein Kamin des Kanals (5) und der Kamin eines Reservoirs (6) mit Stöpseln verschlossen. Anschließend wurden 40  $\mu$ l Hungermedium mittels Pipette durch den offenen Kamin des Kanals (4) vorsichtig eingefüllt. Sobald sich auf dem Kamin des befüllten Reservoirs ein Tropfen gebildet hatte, wurde das Befüllen beendet. Zum Befüllen des anderen Reservoirs wurde dessen Kaminstöpsel auf den Kamin des vollen Reservoirs (7) versetzt. Das Befüllen des zweiten Reservoirs erfolgte äquivalent zu dem des ersten Reservoirs.

Der letzte Schritt galt dem Befüllen eines Reservoirs mit Lockstoff. Dazu wurden beide Kamine des Beobachtungskanals (4, 5) mit Stöpseln verschlossen. Auf den Kamin eines Reservoirs wurde mit einer Pipette ein 18  $\mu$ l-Tropfen des Lockstoffs (FCS) gesetzt und anschließend dieselbe Menge Flüssigkeit aus dem anderen Reservoir abgesaugt. DMEM mit 0,1% Kälberserumalbumin wurde als Lockstofffreies Medium (Hungermedium =  $C_0$ ), FCS als Lockstoff benutzt.

Die Kammern eines  $\mu$ -Slides mit HT-1080 Zellen oder HUVEC im Beobachtungskanal waren wie folgt befüllt:

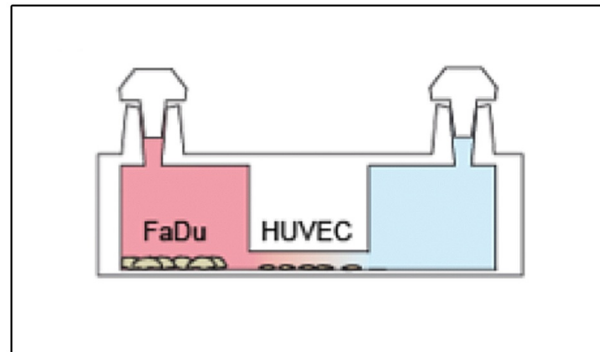
**Tabelle 3.1 Füllzustände eines  $\mu$ -Slides Chemotaxis mit HT-1080 Zellen oder HUVEC**

	Beobachtungskanal	Reservoir 1	Reservoir 2
Negativkontrolle (-/-)	HT-1080	Hungermedium	Hungermedium
Positivkontrolle (+/+)	HT-1080	Lockstoff	Lockstoff
Lockstoffmessung (+/-)	HT-1080	Lockstoff	Hungermedium
Negativkontrolle (-/-)	HUVEC	Hungermedium	Hungermedium
Lockstoffmessung (+/-)	HUVEC	Lockstoff	Hungermedium
Lockstoffmessung (FaDu/-)	HUVEC	FaDu	Hungermedium

Bei der Versuchsreihe mit HUVEC wurde statt der Positivkontrolle (+/+) eine weitere Lockstoffmessung durchgeführt. Für eine bessere Nachahmung der *in vivo* Situation wurden hier gehungerte FaDu-Zellen als Lockstoffquelle verwendet. Hierfür wurde ein Reservoir 12 h vor Beginn des Experimentes mit



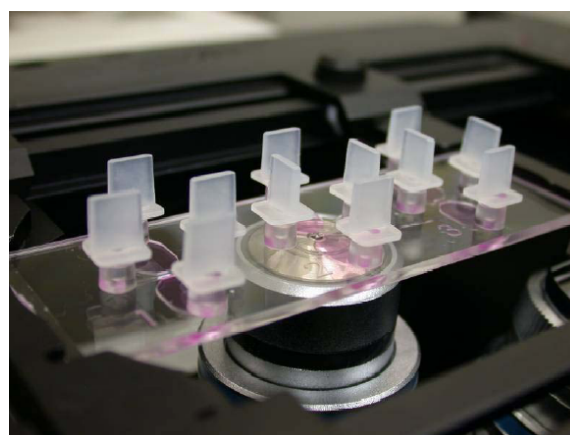
18  $\mu\text{l}$  einer  $8,5 \times 10^5$  Zellen/ml FaDu-Zellsuspension befüllt. FaDu-Zellen wurden in Hungermedium in eines der Reservoirs eingebracht und waren bis zu Beginn des Experimentes adhären auf dem Boden der Chemotaxis-Kammer.



**Abbildung 3.4 Querschnitt einer  $\mu$ -Slide Kammer** mit HUVEC im Beobachtungskanal und FaDu-Zellen in einem Reservoir zur Testung der chemoattraktiven Wirkung von löslichen Faktoren der FaDu-Zellen auf HUVEC.

### 3.2.2.2 Mikroskopie und Lebendzellabbildung

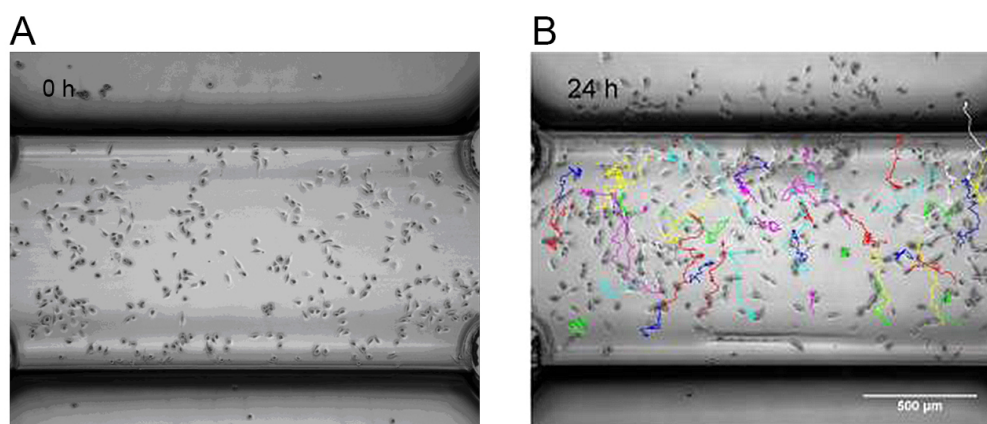
Sobald alle Kammern befüllt waren, wurde das  $\mu$ -Slide unter ein Mikroskop mit einer Lebendzellkammer (Temperatur und  $\text{CO}_2$ - Versorgung entsprechen denen in einem Inkubator) gesetzt.



**Abbildung 3.5 Fotografie eines  $\mu$ -Slides auf dem Mikroskop** [Ibidi GmbH, 2010].

Vor Beginn der Videomikroskopie erfolgte die Programmierung eines Software-gesteuerten Tisches auf dem sich das  $\mu$ -Slide mit den drei nebeneinander

liegenden Kammern befand. Die Position des Tisches wurde so festgelegt, dass sich der erste Beobachtungskanal des Slides unter dem Mikroskop befand. Anschließend positionierte der Tisch den zweiten und den dritten Kanal über das Mikroskop. In vorgegebenen Zeitintervallen wurden Aufnahmen von jedem Beobachtungskanal gemacht. Bei einem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden wurde ein Aufnahmeintervall von 10 Minuten gewählt. Dies ermöglichte die Beobachtung aller drei Kammern eines Slides innerhalb eines Experimentes. Die Software ordnete jede Aufnahme ihrer zugehörigen Kammer der Reihe nach zu. Pro Kammer wurden 144 Aufnahmen (24 Stunden x 60 min ÷ 10 min) gemacht, die der Reihe nach abgespielt, einen Film wiedergaben.



**Abbildung 3.6 Mikroskopische Aufnahme eines Beobachtungskanals.** (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahme von HUVEC im Beobachtungskanal (2 mm x 1 mm) zu Beginn des Experimentes und (B) nach 24 h mit farbiger Markierung der Laufwege der Zellen.

### 3.2.2.3 Auswertung und Datenanalyse

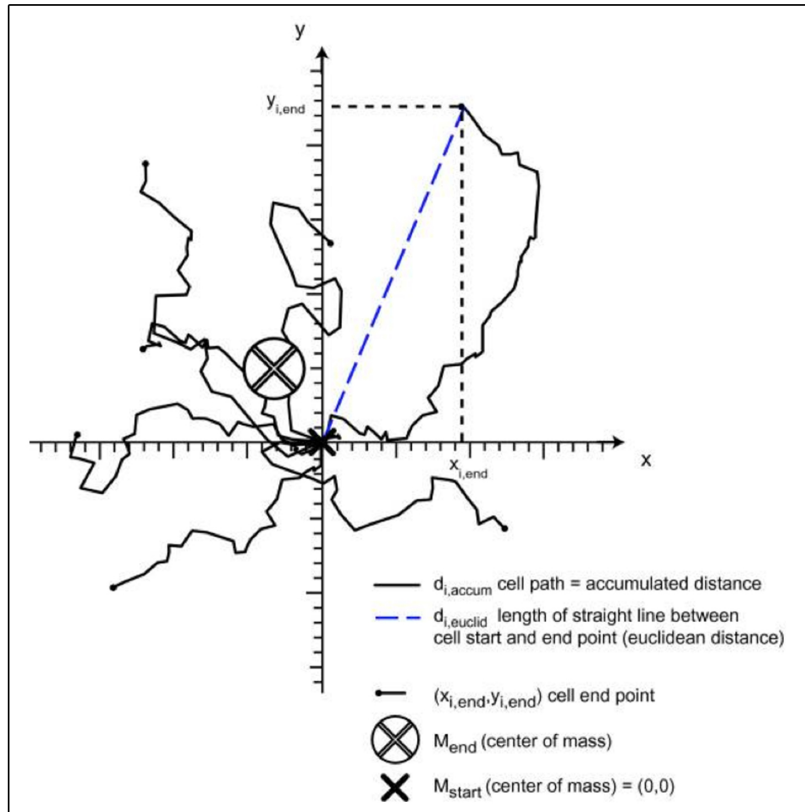
Die Auswertung der Bilder erfolgte zunächst mit der frei verfügbaren Software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA) und anschließend mit der ebenfalls frei verfügbaren Firmen-eigenen Software (<https://lbidi.com>, „Chemotaxis and Migration Tool“). Hierfür wurden pro Kammer mindestens 30 Zellen mit dem Image J plugin „manual tracking“ (Fabrice Cordelières, Institut Curie, Orsay, France) über die Zeit verfolgt. Per Mausklick auf eine Zelle schaltete das Programm automatisch zum nächsten Bild und zeichnete dabei den zurückgelegten Weg dieser Zelle auf. Zellen, die während der Aufnahmen

starben, sich teilten, oder den Beobachtungskanal verließen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Durch die Kalibrierung des objektivspezifischen  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$  Werts konnten die Positionslisten der Zellen von Pixelwerten in Positionsangaben in  $[\mu\text{m}]$  umgerechnet werden.

Für eine weiterführende Analyse und Bewertung des chemotaktischen Prozesses wurde eine frei verfügbare Software, welche als Image J plugin fungiert, entwickelt. Das „Chemotaxis and Migration Tool“ liefert unterschiedliche und auf den Daten des Experimentes basierende graphische Auswertungen sowie statistische Tests. Hierfür wurde die entsprechende „manual tracking“ Ergebnisdatei direkt in das Chemotaxis- und Migration-Tool importiert und die Bildspuren der Zellen auf  $(x=0, y=0)$  zum Zeitpunkt 0 h normiert.

Für die Quantifizierung von Chemotaxis und Migration wurden folgende Werte durch das Programm errechnet:

- Center of mass (Schwerpunkt der Streckenendpunkte)
- x-FMI (Forward Migration Index, x-Abschnitt der zurückgelegten Distanz)
- y-FMI (Forward Migration Index, y-Abschnitt der zurückgelegten Distanz)
- Rayleigh-Test
- Zellgeschwindigkeit
- Direktheit (Nettodistanz / Gesamtdistanz)



**Abbildung 3.7 Graphische Darstellung eines Migrationsverlaufs.** Die Startpunkte jeder Zelle wurden auf  $(x_{i,start}, y_{i,start}) = (0,0)$  zum Zeitpunkt  $t=0$  normiert [Zengel et al. 2011]

### Center of mass ( $M_{end}$ )

Der Center of mass (COM) gibt den Schwerpunkt der Streckenendpunkte aller Zellen an. Sein x- und y-Wert gibt die Richtungstendenz der beobachteten Zellen an.

$$M_{end} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{i,end}, y_{i,end})$$

*x und y forward migration indices (x-FMI, y-FMI) (Fisher 1993, Foxman, Kunkel et al. 1999)*

Die x-FMI und y-FMI geben die zurückgelegte Distanz der Zellen im Bezug auf die x- und y-Achse an. Je größer der Index einer Achse, desto stärker ist auch die chemotaktische Wirkung entlang dieser Achse. Der Einfachheit halber wird der Verlauf der y-Achse parallel, die der x-Achse senkrecht zum Gradienten gesetzt. Demnach gilt  $y-FMI = FMI^{\parallel}$  und  $x-FMI = FMI^{\perp}$ .

$$x_{FMI} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{x_{i,end}}{d_{i,accum}} \quad y_{FMI} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{y_{i,end}}{d_{i,accum}}$$

### *Directness (D)*

Die „Direktheit“ der Migration einer Zelle wird über das Verhältnis der Nettodistanz ( $d_{netto}$ , euklidisch) und der Gesamtdistanz ( $d_{gesamt}$ , akkumuliert) errechnet. Während die Nettodistanz der Länge einer Geraden zwischen dem Anfangs- und Endpunkt einer Zelle entspricht, kommt die Gesamtdistanz der gesamten zurückgelegten Strecke einer Zelle gleich. Eine „Direktheit“ von  $D \rightarrow 1$  entspricht einer geradlinigen Migration von Anfangs- zum Endpunkt.

### *Direktheit einer einzelnen Zelle*

$$D_i = \frac{d_{i,netto}}{d_{i,gesamt}}$$

### *Durchschnittliche Direktheit aller Zellen*

$$D = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n D_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{d_{i,netto}}{d_{i,gesamt}}$$

### *Rayleigh-Test*

Der Rayleigh-Test ist ein statistischer Test welcher angibt, ob zirkulär angeordnete Punkte homogen verteilt sind. Die Nullhypothese mit der Aussage über eine homogene Verteilung von Punkten in einem Kreis wird bei einem p-Wert  $\leq 0.05$  abgelehnt. Demnach liegt bei einem p-Wert  $\leq 0.05$  eine inhomogene Verteilung von Punkten in einem Kreis vor.

### *Statistische Auswertung*

Anschließend wurde die Signifikanz der experimentell gewonnenen Daten in einem gepaarten Student's t-Test mittels der Microsoft Excel Software (Microsoft Corp., Redmond, WA) ermittelt.

## 4 ERGEBNISSE

Wie einleitend beschrieben, bezeichnet Chemotaxis das gerichtete Wandern von Zellen entlang eines Konzentrationsgefälles eines Chemoattraktans. Seit der Erkenntnis, dass sich Zellen gezielt auf ein Signal hinzubewegen, besteht der Wunsch Chemotaxis sichtbar und vor allem messbar zu machen. Bereits seit Lebers erster Beschreibung von Chemotaxis im Jahre 1888 wurden multiple Methoden entwickelt um gerichtete Zellwanderung darzustellen. Allein die Feststellung, dass Chemotaxis in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, zeigt welche Bedeutung einem Chemotaxis-darstellenden und -quantifizierenden System zugeschrieben werden muss. Aufgrund seiner einfachen Versuchsdurchführung und der Bereitstellung eines quantitativen Maßes für Chemotaxis hat sich das Boyden-Kammer System als Goldstandard für Chemotaxismessungen durchgesetzt. Die Boyden-Kammer ist heutzutage das meist genutzte Testverfahren für Chemotaxis in der Zellbiologie. Trotz alledem weist die Boyden-Kammer Nachteile auf, so dass weiterhin der Wunsch nach einem alternativen Testverfahren für Chemotaxis besteht. Das  $\mu$ -Slide der Firma Ibidi soll Verbesserungen hinsichtlich der Nachteile der Boyden-Kammer aufweisen. Die vorliegende Arbeit widmete sich hauptsächlich der experimentellen Gegenüberstellung der beiden Systeme, Boyden-Kammer und  $\mu$ -Slide. Hierfür wurden Chemotaxisversuche mit beiden Testverfahren durchgeführt. Als Lockstoffsubstanz wurde eine 10%-haltige FCS-Lösung gewählt. Da bekannt ist, dass Hypopharynx-Karzinomzellen und andere maligne Tumore angiogenetische Faktoren wie VEGF exprimieren und damit Endothelproliferation, Migration und Chemotaxis hervorrufen, wurde für eine bessere Nachahmung der *in vivo* Situation bei der Versuchsreihe mit den Endothelzellen HUVEC zusätzlich die chemotaktische Wirkung von löslichen Faktoren der Hypopharynx-Karzinomzellen (FaDu) untersucht (Lalla, Boissoneau et al. 2003).

## **4.1 Zellmigration in der Boyden-Kammer**

Durch die porendurchsetzte Membran der Boyden-Kammer findet der Aufbau eines Konzentrationsgradienten in die eine, sowie Zellmigration in die andere Richtung statt. Nach Befüllen der Boyden-Kammern migrieren die Zellen in die Richtung des Lockstoffes.

### **4.1.1 Einfluss von FCS auf die Migration von HT-1080 Zellen**

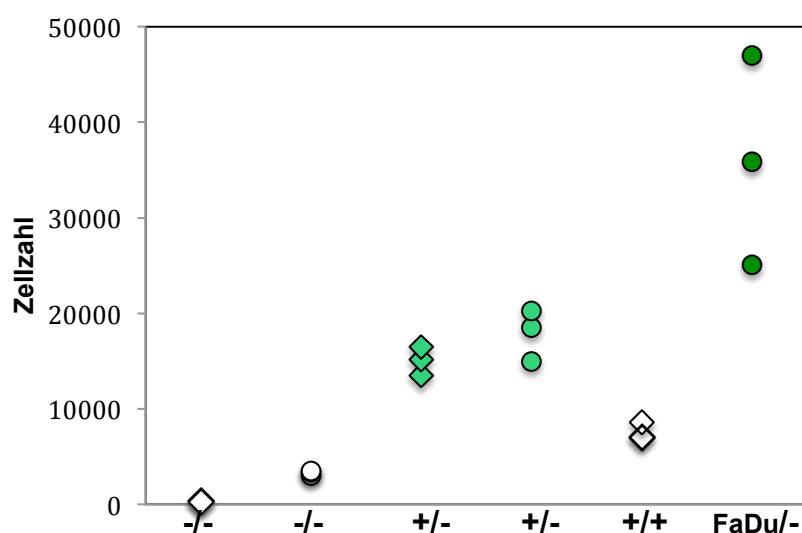
Die Zellkultur-Inserts der Boyden-Kammern wurden mit 0,5 ml einer  $2 \times 10^5$  HT-1080 Zellen/ml Zellsuspension befüllt. Eine Versuchsreihe bestand aus einer Lockstoffmessung (+/-) und zwei Referenzmessungen (+/+) und (-/-). Während bei der Lockstoffmessung das untere Kompartiment mit einer 10%-igen FCS-Lösung (Lockstoffmedium) und das obere Kompartiment mit Hungermedium befüllt wurden, wurden die Kompartimente der Referenzmessungen gleichermaßen entweder mit Lockstoff- oder Hungermedium befüllt. Referenzmessungen mit Lockstoff- oder Hungermedium in beiden Kompartimenten wurden als "Positivkontrolle" (+/+) bzw. "Negativkontrolle" (-/-) bezeichnet.

Nach einer Inkubationszeit von 6 h, einer Anfärbung der Zellen auf der Unterseite der Membran mittels Trypanblau und Isolierung der Membran auf einem Objektträger konnte über das Auszählen der migrierten Zellen die Chemotaxis quantifiziert werden. Die gefärbten Zellen wurden im Mikroskop ausgezählt und die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die Einzelwerte sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

**Tabelle 4.1 Mittelwerte aller durchgeführten Versuche in der Boyden-Kammer**

		Zahl der Experimente	Zellzahl	Standard-abweichung	p-Wert	
HT-1080	-/-	n = 3	301	68,9	0,0033	
	+/-	n = 3	15041	1489,5		
	+/+	n = 3	7527	911,9	0,0035	0,0051
HUVEC	-/-	n = 3	3307	239,6		
	+/-	n = 3	17908	2695,9	0,0107	
	FaDu/-	n = 3	35968	10944,6	0,0354	0,0961

Der p-Wert entspricht der Testgröße des t-Tests für unabhängige Stichproben, mit dem untersucht wurde, ob sich die Chemotaxisversuche mit Gradient (+/-) , (FaDu/-) signifikant von denen ohne Gradient (+/+) , (-/-) unterscheiden. Grüner und roter p-Wert beziehen sich auf die Referenzmessungen (+/+) und (-/-) im HT-1080 Experiment bzw. auf die Lockstoffmessungen (+/-) und (FaDu/-) im HUVEC Experiment.



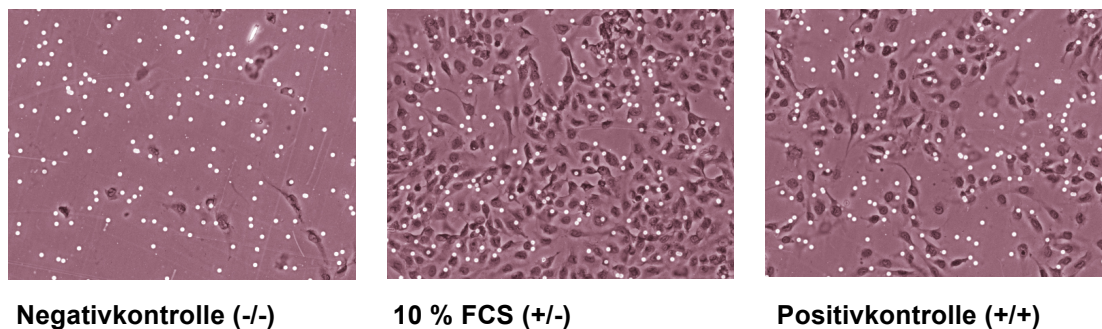
**Abbildung 4.1 Schematische Darstellung aller Boyden-Kammer-Versuche.** Jede Raute (HT-1080) und jeder Kreis (HUVEC) repräsentiert die ausgezählte Zellzahl eines einzelnen Versuchs. Referenzmessungen ohne Gradient (-/-) und (+/+) sind weiß, Lockstoffmessungen sind grün markiert. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

Tabelle 4.1 zeigt, dass die höchste Transmigration im HT-1080 Experiment bei der Lockstoffmessung (+/-) stattgefunden hat. Hier sind mit einer mittleren Zellzahl von 15041 Zellen/Membran 50 mal so viele Zellen durch die Membran gewandert als in der Messung ohne Lockstoff (-/-) und doppelt so viele als in der Messung, bei der sich Lockstoff in beiden Kompartimenten der Boyden-Kammer (+/+) befand. Die ermittelten p-Werte von  $p=0,0035$  und  $p=0,0033$  zeigten einen signifikanten Unterschied in der Zellmigration zwischen der Lockstoffmessung und der Positiv- bzw. Negativkontrolle. Trotz Fehlen eines Gradienten in den

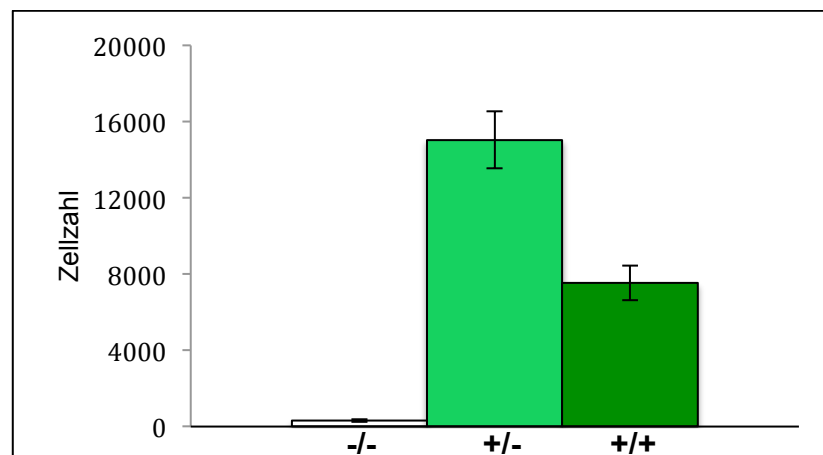


beiden Referenzmessungen (+/+) und (-/-) zeigte sich mit einem p-Wert von 0,0051 (grüner Wert in Tabelle 4.1) ein signifikanter Unterschied zwischen der Positiv- und Negativkontrolle. Die Lockstoffzugabe in beiden Kompartimenten der Boyden-Kammer führte hier zu einer Steigerung der Zellmigration um das 25-fache.

Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch die gefärbten Membranen eines Versuchsaufbaus mit HT-1080 Zellen. Hier ist zu sehen, dass deutlich mehr Zellen in (+/-) durch die Membran migrierten als in (-/-) und (+/+).



**Abbildung 4.2 Durchlichtmikroskopische Aufnahmen** (200-fache Vergrößerung) einer Boyden-Kammer-Membran mit gefärbten HT-1080 Zellen; der Kontrast der Fotos wurde nachträglich für eine bessere Darstellung erhöht.

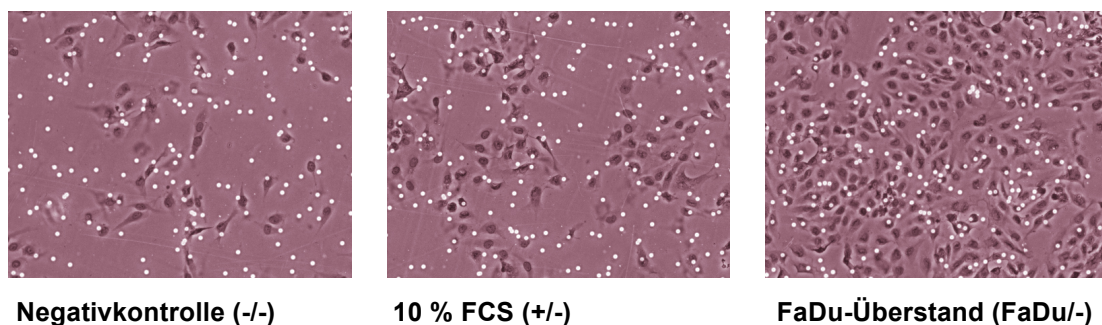


**Abbildung 4.3 Darstellung der Zellmigration über die Zellzahl.** Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurden die HT-1080 Zellen, die durch die Membran migriert sind, im Mikroskop ausgezählt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

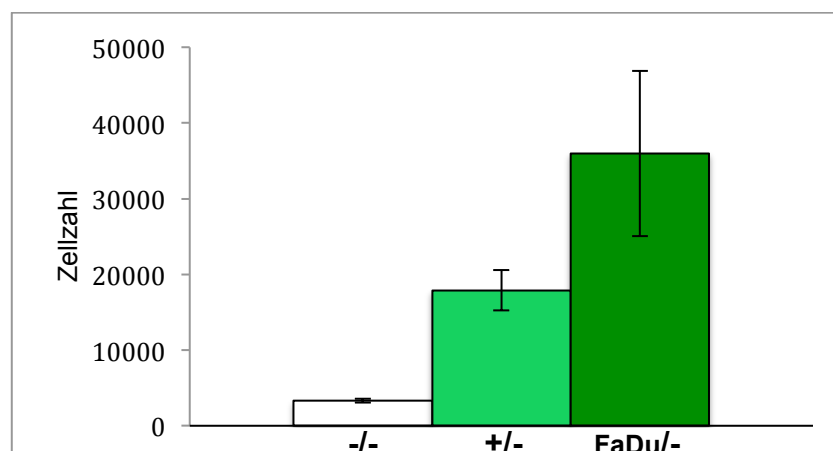
Im Anschluss wurde das Migrationsverhalten von menschlichen Endothelzellen (HUVEC) in der Boyden-Kammer untersucht.

#### 4.1.2 Einfluss von konditioniertem FaDu-Überstand auf die Migration von HUVEC

Der Versuchsaufbau zur Messung der Migration von HUVEC war bis auf die Positivkontrolle äquivalent zu dem von HT-1080 Zellen. Statt der Positivkontrolle wurde für eine bessere Nachahmung der *in vivo* Situation eine weitere Lockstoffversuchsreihe durchgeführt. Bei dem zweiten Lockstoff wurde Überstand von gehungerten Hypopharynx-Karzinomzellen (FaDu) verwendet (FaDu/-). Auch hier erfolgte die Auswertung über Auszählen der migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran. Abbildung 4.4 zeigt repräsentative Ausschnitte von Boyden-Kammer-Membranen mit HUVEC mit FCS (+/-) und konditioniertem FaDu-Überstand (FaDu/-) als Lockstoff im unteren Kompartiment und ohne Lockstoff (-/-).



**Abbildung 4.4 Durchlichtmikroskopische Aufnahmen** (200-fache Vergrößerung) einer Boyden-Kammer-Membran mit gefärbten HUVEC; der Kontrast der Fotos wurde nachträglich für eine bessere Darstellung erhöht.



**Abbildung 4.5 Darstellung der Zellmigration über die Zellzahl.** Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurden HUVEC, die durch die Membran migriert sind, im Mikroskop ausgezählt. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Auch hier konnten deutlich mehr Zellen auf der Unterseite der Membran ausgezählt werden, wenn sich im unteren Kompartiment ein Lockstoff befand. Während im Mittel 3307 Zellen durch die Membran migrierten wenn kein Lockstoff (-/-) zugegen war, konnten im Mittel 17908 Zellen durch eine 10%-ige FCS-Lösung (+/-) und im Mittel 35968 Zellen durch konditionierten FaDu-Zellkulturüberstand (FaDu/-) auf der Unterseite der Membran ausgezählt werden. Die beobachteten Unterschiede in der Migration von HUVEC waren mit p-Werten von 0,0107 für (+/-) und 0,0354 für (FaDu/-) ebenfalls signifikant. Befand sich im unteren Kompartiment FaDu-Überstand (FaDu/-) sind im Mittel doppelt so viele Zellen durch die Membran gewandert als bei den Versuchen mit Vollmedium (+/-) als Lockstoff. Mit einem p-Wert von 0,0961 (roter Wert in Tabelle 4.1) war der beobachtete Unterschied der Lockstoffmessungen (+/-) und (FaDu/-) nicht signifikant.

Im Anschluss wurde das Migrationsverhalten der gleichen Zelllinien im  $\mu$ -Slide Chemotaxis untersucht.

## **4.2 Migrationsverhalten im $\mu$ -Slide**

Nach Befüllen des  $\mu$ -Slides baut sich über Diffusion im Reservoir ein Konzentrationsgefälle des Lockstoffs auf, welches zum Beobachtungskanal hin linear abnimmt. Das Migrationsverhalten der Zellen im Beobachtungskanal konnte direkt unter dem Mikroskop über 24 Stunden beobachtet werden. Die Auswertung erfolgte über „cell tracking“ und eine zur Datenanalyse entwickelte Software, welche über die Laufwege der jeweiligen Zellen die Werte „center of mass“, „y-FMI“, „x-FMI“, „Rayleigh-Test“, „Directness“ und Zellgeschwindigkeit berechnete.

### 4.2.1 Direkte Migration von HT-1080 Zellen auf ein Gradient aus FCS

Um willkürliche Chemokinese von gerichteter Chemotaxis zu unterscheiden wurden pro Experiment zwei Kontrollmessungen durchgeführt. Bei der Negativkontrolle (-/-) wurde die Zellmigration in Hungermedium ohne Zugabe eines Lockstoffes beobachtet. Bei der Positivkontrolle (+/+) wurden beide Reservoirs mit Vollmedium befüllt. Zuletzt enthielt im (+/-) Versuch nur eines der beiden Reservoirs FCS als Lockstoff. Da jedes  $\mu$ -Slide drei Kammern beinhaltet konnten pro Versuchsaufbau ein (+/-) Versuch sowie die beiden Referenzmessungen (+/+) und (-/-) durchgeführt werden. Jedes Experiment wurde dreifach durchgeführt. Die Quantifizierung der Zellmigration erfolgte über die Parameter COM, FMI, Rayleigh-Test, Zellgeschwindigkeit und Directness, welche im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Nach Befüllen des  $\mu$ -Slides wurden über Videomikroskopie die Migrationsverläufe der einzelnen Zellen aufgenommen. Die aufgenommenen Bildspuren der Zellen wurden von Pixelwerten in Positionsangaben in  $\mu\text{m}$  umgerechnet und in ein Koordinatensystem, bei dem die Startpunkte jeder Zelle auf den Koordinatenursprung mit  $(x,y) = (0,0)$  zum Zeitpunkt  $t=0$  normiert wurden, überführt. So konnten die Migrationsverläufe in einem auf den Koordinatenursprung zentrierten Plot graphisch dargestellt werden. Anhand dieses Plots war es möglich eine erste Einschätzung zu treffen, in welche Richtung die Zellen wanderten und ob es sich bei dem vorliegenden Migrationsverlauf um Chemotaxis handelte oder nicht. Auf der Grundlage eines solchen Plots konnten anschließend die Parameter COM, FMI, Rayleigh-Test Directness und Zellgeschwindigkeit für eine genauere Quantifizierung der Chemotaxis bestimmt werden. Während der COM (center of mass) den Schwerpunkt der Streckenendpunkte aller Zellen beschreibt, gibt der x-FMI und y-FMI (forward migration index) die Zellbewegung in Richtung x-Achse ( $\text{FMI}^{\perp}$ ) bzw. y-Achse ( $\text{FMI}^{\parallel}$ ) an. Über den Rayleigh-Test wird die Wahrscheinlichkeit, ob das erhaltene Migrationsmuster einem zufällig eingetretenem Ereignis entspricht, berechnet. Während Werte  $> 0,05$  einem zufälligen, homogenen Migrationsmuster entsprechen, geben Werte  $\leq 0,05$  ein inhomogenes Muster an

und deuten auf chemotaktisch induzierte Einflüsse hin. Die „Directness“ beschreibt die Tendenz einer Zelle in einer geraden Linie zu wandern. Eine Direktheit von  $D \geq 1$  entspricht einer geradlinigen Migration vom Start- zum Endpunkt. Inwieweit sich Chemotaxis über diese Parameter ausdrücken lässt bleibt zu prüfen und soll im Folgenden diskutiert werden.

Die Mittelwerte aller Experimente wurden in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Parameter COM, FMI und Rayleigh-Test sind ergänzend zu Tabelle 4.2 in Abbildung 4.6 graphisch zusammengefasst. Die in Abbildung 4.7 dargestellten Migrationsverläufe der Zellen stammen exemplarisch aus einem Experiment. Da sich der forward migration index aus den beiden Werten y- und x-FMI zusammensetzt, sind die FMI-Werte zur besseren Veranschaulichung in Tabelle 4.3 zusammengefasst und die y-FMI-Werte der Lockstoffmessungen farblich hinterlegt.

**Tabelle 4.2 Mittelwerte aller im  $\mu$ -Slide gewonnener Migrationsparameter**

COM (center of mass), FMI (forward migration index) mit y-FMI =  $FMI^{\parallel}$  parallel und x-FMI =  $FMI^{\perp}$  senkrecht zum Gradienten, p-Value (Rayleigh-Test), Directness (Direktheit), Velocity (Zellgeschwindigkeit).

		COM	FMI		p-Value	Directness	Velocity
		[ $\mu\text{m}/24\text{h}$ ]	$\parallel$	$\perp$	(Rayleigh-Test)		[ $\mu\text{m}/\text{h}$ ]
HT-1080	-/-	6,2	0,01	0,01	0,59	0,15	18,6
	+/+	2,0	0,00	0,01	0,73	0,13	43,2
	+/-	125	0,22	-0,02	6,4425E-06	0,31	22,8
HUVEC	-/-	14,5	0,08	0,09	0,18	0,4	14,1
	+/-	38,3	0,14	-0,01	6,8488E-05	0,27	23,2
	FaDu/-	42,8	0,18	0,08	0,0011	0,4	15,5

**Tabelle 4.3 FMI-Mittelwerte** von (A) HT-1080 Zellen und (B) HUVEC

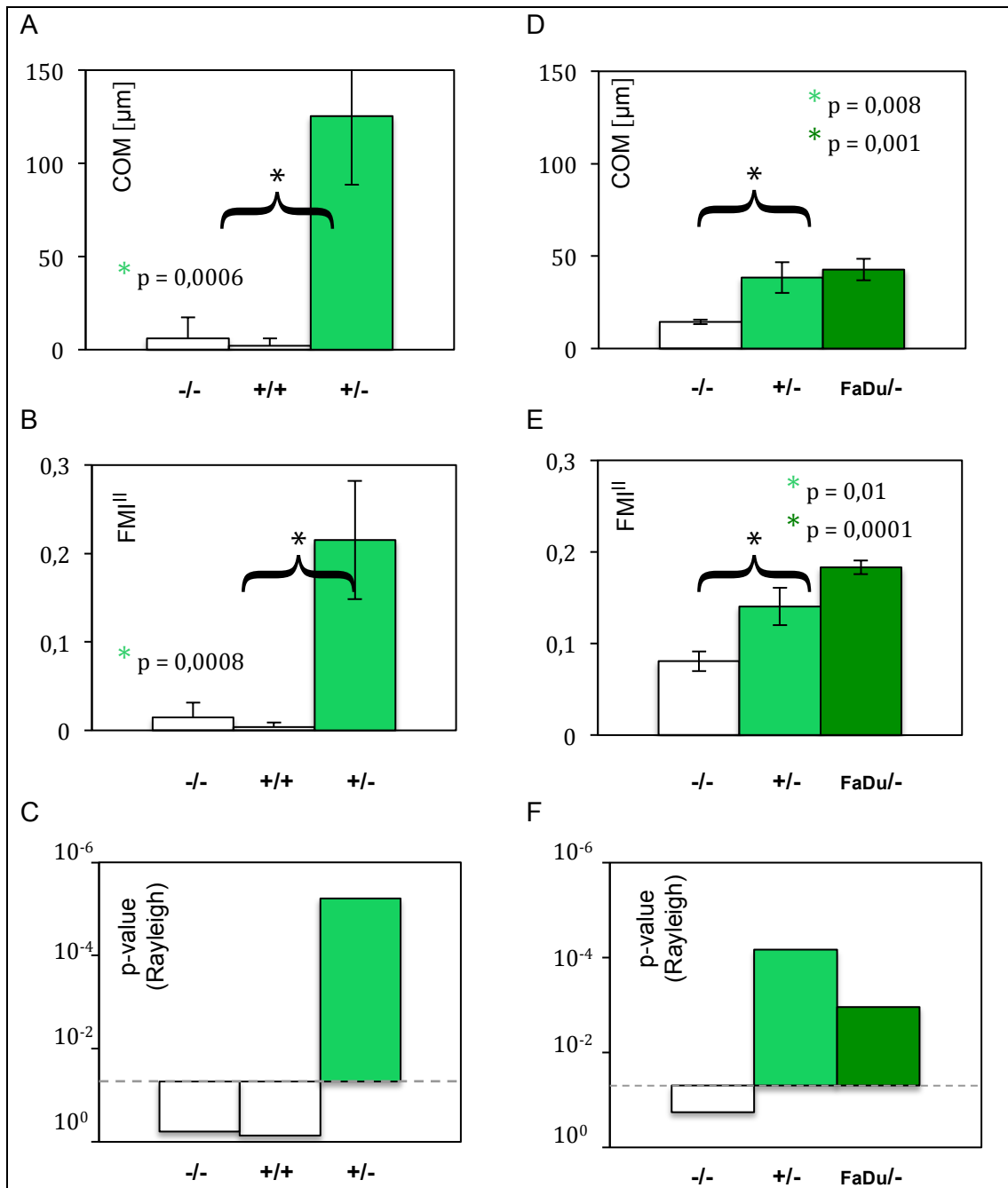
mit  $FMI^{\parallel}$  parallel und  $FMI^{\perp}$  senkrecht zum Gradienten.  $FMI^{\parallel}$ -Werte der Lockstoffmessungen sind grün markiert.

**A**

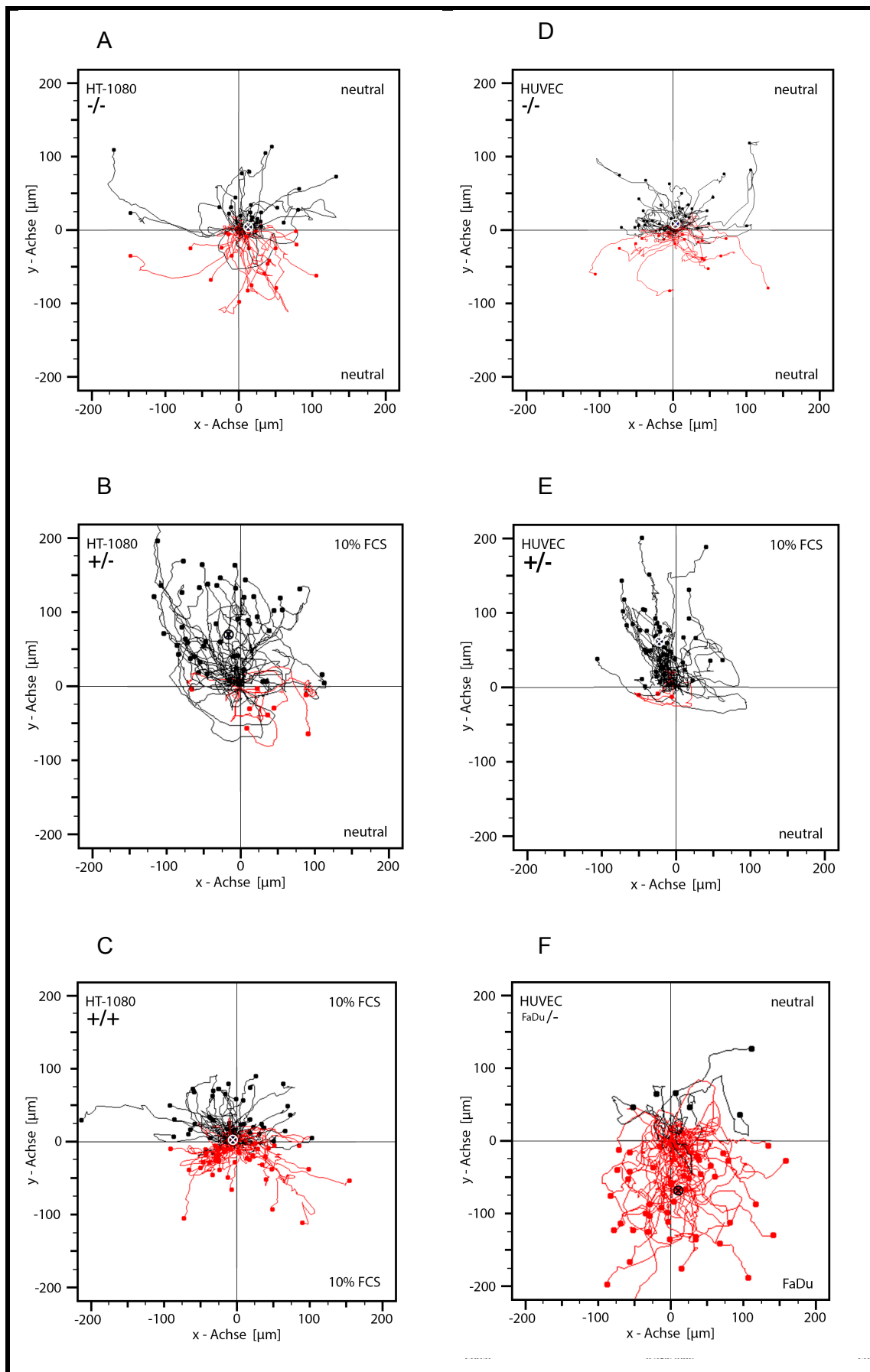
HT-1080	$FMI^{\parallel}$	$FMI^{\perp}$
-/-	0,01	0,01
+/+	0,00	0,01
+/-	0,22	-0,02

**B**

HUVEC	$FMI^{\parallel}$	$FMI^{\perp}$
-/-	0,08	0,09
+/-	0,14	-0,01
FaDu/-	0,18	0,08



**Abbildung 4.6 Schematischer Vergleich von (A,D) COM, (B,E) FMI<sup>II</sup> und (C,F) p-Value (Rayleigh-Test) der (A-C) HT-1080 und (D-F) HUVEC Versuchsreihe.** Jede Säule entspricht einem Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichungen. Referenzmessungen ohne Gradienten sind als weiße Säulen, Lockstoffmessungen als grüne Säulen dargestellt. Die in (A, B, D, E) angegebenen p-Werte entsprechen der Testgröße des t-Tests für unabhängige Stichproben, mit dem untersucht wurde, ob sich Lockstoffmessungen signifikant von ihren jeweiligen Negativkontrollen unterscheiden. (C, F) p-Werte des Rayleigh-Tests auf einer logarithmischen Skala. Die gestrichelte Linie markiert die 0,05-Grenze, ab der eine inhomogene Zellverteilung stattgefunden hat.



**Abbildung 4.7 Migrationsverlauf von HT-1080 Zellen und HUVEC in dem  $\mu$ -Slide.** Beschriftungen im rechten oberen und unteren Quadranten zeigen verwendete Medien der beiden Reservoirs einer  $\mu$ -

Slide-Kammer entlang der y-Achse parallel zum Gradienten an. Beschriftung im linken oberen Quadranten zeigen verwendete Zelllinie und Füllzustand. Rot markierte Bahnen zeigen Migrationswege in negativer y-Achsen-Richtung, schwarz markierte Bahnen in positiver y-Achsen-Richtung. A-C: Repräsentativer Plot eines HT-1080 Experimentes über 24 Stunden. (A) Negativkontrolle (-/-), bei der beide Reservoirs mit Hungermedium (ohne FCS) gefüllt sind. Gerichtete Zellmigration ist nicht sichtbar. (B) Chemotaxis-Experiment mit 10 % FCS als Lockstoff (+/-). Zellen wandern in die positive Richtung der y-Achse, welche per Definition die Richtung des Gradienten darstellt. (C) Positivkontrolle (+/+), bei der beide Reservoirs mit 10 % FCS gefüllt sind. Es findet keine gerichtete Zellmigration statt. D-F: Repräsentativer Plot eines HUVEC-Experimentes über 24 Stunden. (D) Negativkontrolle (-/-) ohne gerichtete Zellmigration und diskreter Verlagerung des Massenschwerpunktes COM. (E) Chemotaxis-Experiment mit 10 % FCS in positiver y-Achsen-Richtung. Zellen wandern parallel zur y-Achse in positive Richtung. (F) Chemotaxis-Experiment mit FaDu-Zellen in negativer y-Achsen-Richtung. Zellmigration findet parallel zur y-Achse in negativer Richtung statt.

Unter der Annahme, dass die Zellen im  $\mu$ -Slide in Abwesenheit eines Gradienten homogen in alle Richtungen wandern, deuten kleine COM-Werte, welche nahe am Koordinatenursprung liegen, auf ein ungerichtetes Migrationsmuster, und hohe COM-Werte demnach auf ein gerichtetes Wandern der Zellen. Diese Annahme wird in der Versuchsreihe mit HT-1080 Zellen bestätigt. Tabelle 4.2 zeigt für die Lockstoffmessung (+/-) mit HT-1080 Zellen einen hohen mittleren COM-Wert von 125  $\mu\text{m}$  über 24 Stunden im Vergleich zu den Referenzmessungen, bei denen der mittlere COM-Wert 6,2  $\mu\text{m}/24\text{h}$  für die Negativkontrolle (-/-) und 2,0  $\mu\text{m}/24\text{h}$  für die Positivkontrolle betrug. Auch die FMI-Werte deuten auf chemotaktische Einflüsse in der Lockstoffmessung. Der  $\text{FMI}^{\text{II}}$ -Wert war im Falle der Lockstoffmessung mit 0,22 im Mittel der größte unter den FMI-Werten (siehe Tabelle 4.3 A). Da sich Zellen im  $\mu$ -Slide in Gegenwart eines Lockstoffes parallel zum Gradienten bewegen, stellen hohe y-FMI-Werte ( $\text{FMI}^{\text{II}}$ ) kombiniert mit kleinen x-FMI-Werten ( $\text{FMI}^{\text{I}}$ ) ein Indiz für Chemotaxis dar. Für beide Referenzmessungen (+/+) und (-/-) wurden kleine FMI-Werte entlang der y- und x-Achse, in anderen Worten parallel und senkrecht zum Gradienten, mit 0,00 für den mittleren  $\text{FMI}^{\text{II}}$ -Wert der Positivkontrolle und 0,01 für den mittleren  $\text{FMI}^{\text{I}}$ -Wert der Positivkontrolle sowie beide FMI-Werte der Negativkontrolle, erzielt. Der im Rayleigh-Test ermittelten p-Wert von  $6,44 \cdot 10^{-6}$  der Lockstoffmessung (+/-) lag deutlich  $< 0,05$ , was wiederum auf eine inhomogene Zellverteilung schließen lässt. Im Gegensatz dazu wird eine homogene Verteilung von Zellen über mittlere p-Werte von 0,59 für die Negativ- und 0,73 für die Positivkontrolle verdeutlicht. Die „Directness“-Werte lagen für (+/+) im Mittel bei 0,13, für (-/-) bei 0,15 und für (+/-) bei 0,31. Per Definition sprechen Werte  $\geq 1$  für eine geradlinige Migration, was in der HT-1080



Versuchsreihe weder auf die Lockstoff- noch auf die Referenzmessungen zutrifft. Mit einer mittleren Zellgeschwindigkeit von 43,2  $\mu\text{m/h}$  wanderten die Zellen in der Positivkontrolle (+/+) am schnellsten. Im Vergleich dazu wanderten die Zellen in der Lockstoffmessung (+/-) mit einer mittleren Zellgeschwindigkeit von 22,8  $\mu\text{m/h}$  und in der Negativkontrolle (-/-) mit 18,6  $\mu\text{m/h}$  nur annähernd halb so schnell.

In Abbildung 4.6 ist zu sehen, dass sich der COM- (A) sowie der FMI<sup>II</sup>-Wert (B) der Lockstoffmessung mit einem p-Wert von 0,0006 bzw. 0,0008 signifikant von denen der Negativkontrolle unterscheiden.

Abbildung 4.7 B zeigt, dass von 57 „getrackten“ HT-1080 Zellen mit 49 Zellen, welche in den oberen beiden Quadranten gezählt werden können (schwarze Bahnen), 86 % Richtung Lockstoff migrierten. Dahingegen wanderten in den Referenzmessungen annähernd gleich viele Zellen in die positive und negative y-Achsen-Richtung. Von insgesamt 94 verfolgten Zellen befanden sich in der Positivkontrolle (Abbildung 4.7 C) nach 24 Stunden 52% in den oberen (schwarz) und 48% der Zellen (rot) in den unteren Quadranten. Bei der Negativkontrolle (Abbildung 4.7 A) konnten von 50 Zellen 54% „oben“ und 46% „unten“ gezählt werden.

#### **4.2.2 Direkte Migration von HUVEC im $\mu$ -Slide**

Wie bei den Versuchen in der Boyden-Kammer wurde im  $\mu$ -Slide neben dem Migrationsverhalten von HT-1080 Zellen das der HUVEC analysiert. Hierfür wurde der Beobachtungskanal mit HUVEC versehen. In dieser Versuchsreihe wurde auf die Positivkontrolle verzichtet. Stattdessen wurden zwei Lockstoffmessungen sowie eine Negativkontrolle (-/-) durchgeführt. Bei den Lockstoffmessungen wurde eines der beiden Reservoirs mit einem Lockstoff versehen, während das andere Reservoir Hungermedium enthielt. Auch hier wurde FCS als Lockstoff verwendet (+/-). Bei der zweiten Lockstoffmessung wurde für eine bessere Nachahmung der *in vivo* Situation ein Reservoir mit gehungerten FaDu-Zellen (FaDu/-) versehen und dabei die chemotaktische Wirkung von löslichen Faktoren von FaDu-Zellen auf Endothelzellen getestet.

Auch hier lassen analog zum HT-1080 Experiment hohe COM-Werte auf einen gerichteten Migrationsverlauf schließen. Nach 24 h konnten für die Lockstoffmessungen im Mittel vergleichbar hohe COM-Werte (siehe Tabelle 4.2) mit  $38,3 \mu\text{m}$  (+/-) und  $42,8 \mu\text{m}$  (FaDu/-) bestimmt werden. Im Vergleich dazu betrug der COM-Wert der Negativkontrolle (-/-) mit  $14,5 \mu\text{m}$  nach 24 h einen um den Faktor 2,6 kleineren Wert als (+/-) sowie um den Faktor 2,9 kleineren Wert als (FaDu/-). Ergänzend dazu wird die Migrationstendenz der Zellen in Richtung Lockstoff, was hier einer positiven y-Achsen-Richtung entspricht, durch hohe  $\text{FMI}^{\text{II}}$ -Werte ausgedrückt. Auch hier konnten wie im HT-1080 Versuch die höchsten  $\text{FMI}^{\text{II}}$ -Werte mit 0,14 für (+/-) und 0,18 für (FaDu/-) kombiniert mit vergleichsweise kleinen  $\text{FMI}^{\perp}$ -Werten mit -0,01 für (+/-) und 0,08 für (FaDu/-) ermittelt werden (siehe Tabelle 4.3). Dahingegen wanderten die Zellen in der Negativkontrolle mit einem mittleren y-FMI von 0,08 und x-FMI von 0,09 gleich „weit“ in y- bzw. x-Achsen-Richtung. Eine signifikant inhomogene Zellverteilung der beiden Lockstoffmessungen konnte mit deutlich unter 0,05 liegenden p-Werten im Rayleigh-Test aufgezeigt werden. Der mittlere p-Wert betrug bei der Lockstoffmessung mit FCS (+/-)  $6,85 \cdot 10^{-5}$  und mit FaDu-Zellen (FaDu/-)  $1,1 \cdot 10^{-3}$ . Hingegen zeigte der p-Wert der Negativkontrolle, mit einem über 0,05 liegenden Wert von 0,18, eine homogene Verteilung der Zellstreckenendpunkt an (siehe Tabelle 4.2). Während sich die Parameter COM, FMI und Rayleigh-Test der Lockstoffmessungen signifikant von denen der Negativkontrolle unterschieden (siehe p-Werte Abbildung 4.6 A, B, C), ließen sich die Parameter Zellgeschwindigkeit und „Directness“ in Gegenwart eines Lockstoffes nicht klar von denen ohne Lockstoff abgrenzen. Die Zellgeschwindigkeit war mit  $23,2 \mu\text{m/h}$  bei (+/-) im Gegensatz zu  $14,1 \mu\text{m/h}$  (-/-) und  $15,5 \mu\text{m/h}$  (FaDu/-) am höchsten. Die Direktheit betrug bei der Negativkontrolle (-/-) und der Lockstoffmessung mit FaDu-Zellen (FaDu/-) 0,4, bei der Lockstoffmessung mit FCS (+/-) 0,27. Demnach wanderten die Endothelzellen weder mit noch ohne Lockstoff in einer geraden Linie von Anfangs- bis zum Endpunkt.

Ergänzend dazu konnte die erhöhte Zellmigration der HUVEC in Richtung Lockstoff in Abbildung 4.7 D-F graphisch dargestellt werden. Von insgesamt 51 „getrackten“ Zellen wanderten mit 48 Zellen 94% Richtung FCS (Abbildung 4.7 E) und mit 45 Zellen 88% Richtung FaDu (Abbildung 4.7 F). Von insgesamt 56

verfolgten Zellen konnten in der Negativkontrolle 66% der Zellen in den oberen und 34% in den unteren Quadranten nach 24 Stunden gezählt werden.

## 5 DISKUSSION

Heute ist bekannt, dass Chemotaxis in vielen physiologischen sowie pathologischen Prozessen, wie Angiogenese, Immunantwort, Tumorwachstum und –metastasierung, eine entscheidende Rolle spielt. Die Forschung im Bereich der Chemotaxis stellt inzwischen einen wichtigen Grundsatz zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei der Bekämpfung von malignen Tumoren und chronisch entzündlichen Erkrankungen dar. Effektive Systeme zur Messung der Chemotaxis sind daher zu einem erstrebenswerten Ziel in der Forschung geworden. Dabei hat sich die Boyden-Kammer zu einem der meist genutzten Testverfahren für Chemotaxismessungen etabliert. Dem Versuchsaufbau liegt das Prinzip zweier durch eine durchlässige Membran getrennter Kompartimente zugrunde. Indem die Kompartimente mit Flüssigkeiten unterschiedlicher Konzentrationen gefüllt werden, kommt es über Diffusion durch die Membran zur Bildung eines Gradienten. Zellen des oberen Kompartimentes können die Membran auf Grund des Porendurchmessers von 8  $\mu\text{m}$  nicht passiv sondern nur über aktive Transmigration überwinden. Das Maß an Chemotaxis wird rein quantitativ über die Ermittlung der Zellzahl auf der anderen Seite der Membran dargestellt. Aufgrund der simplen Versuchsdurchführung ist es zu einer weiten Verbreitung dieser Methode, welche noch von vielen Forschern (2-Kammer-Systeme) modifiziert wurde, gekommen. Jedoch birgt diese Methode gewisse Nachteile. Den 2-Kammer-Systemen mangelt es unter anderem an der Möglichkeit zur Lebendzellmikroskopie sowie an einem stabilen Gradientenaufbau. Alternative Testverfahren, so auch das 2007 auf den Markt gebrachte  $\mu$ -Slide Chemotaxis der Firma Ibidi, wurden entwickelt.

Über die Durchführung von Chemotaxisversuchen mit den gleichen Zelllinien und Lockstoffen unter Verwendung beider Testverfahren soll diese Arbeit einen direkten Vergleich zwischen dem bisherigen Goldstandard für Chemotaxismessungen, der Boyden-Kammer, und dem  $\mu$ -Slide Chemotaxis geben. Dabei sollten die Vor- und Nachteile beider Systeme erforscht werden.

## **5.1 Bewertung der Ergebnisse**

### **5.1.1 Chemotaxis in der Boyden-Kammer**

Es wurde die chemotaktische Wirkung von FCS auf HT-1080 Zellen sowie FCS und FaDu-Überstand auf HUVEC in der Boyden-Kammer untersucht.

Möchte man einer Substanz eine chemotaktische Wirkung zuschreiben, so sollte diese in der Boyden-Kammer eine erhöhte Zellzahl transmigrierter Zellen im Gegensatz zu seinen Referenzmessungen, welche den Lockstoff in beiden oder in keiner von beiden Kammern enthalten, auslösen. So können hohe Zellzahlen in Lockstoffmessungen im Vergleich zu niedrigen Zellzahlen auf der Unterseite der Membran in Referenzmessungen, darauf hinweisen, dass es sich im Falle der Lockstoffmessung um Chemotaxis handelt (Keller 1966, Phelps 1969).

Bei beiden Zelllinien konnte mit Hilfe des t-Testes für unabhängige Stichproben ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen den jeweiligen Kontrollmessungen ohne Gradient (-/-) und (+/+) und den Messungen mit Gradient (+/-) und (FaDu/-) gezeigt werden. In anderen Worten fand deutlich mehr Zellmigration statt, wenn ein Lockstoff zugegen war.

Unter den Lockstoffmessungen fand die höchste Transmigration im HUVEC Experiment, bei dem konditionierter FaDu-Überstand als Lockstoff verwendet wurde, statt. Bezogen auf die Ausgangszellzahl, die zu Beginn des Versuches in das obere Kompartiment der Boyden-Kammer pipettiert wurde, befanden sich nach einer Inkubationszeit von 6 h 36% der HUVEC auf der Unterseite der Membran. Dahingegen löste FCS als Lockstoff eine vergleichbar hohe Transmigration bei HUVEC und HT-1080 Zellen mit 18% bzw. 15% der Gesamtzellen aus. Die Ergebnisse zeigen, dass der konditionierte FaDu-Überstand eine um das 2-fach erhöhte Transmigration der Endothelzellen auslöste als FCS. Dass Tumorzellen, so auch Hypopharynx-Karzinomzellen, in der Lage sind über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF und bFGF Endothelproliferation und -migration zu bewirken, ist im Allgemeinen bekannt und kann auch in den gewonnenen Ergebnissen dargestellt werden (Folkman 1992, Bikfalvi 2007).

Da eine Transmigration ein aktives Durchwandern der Zellen durch die Poren bedeutet, sollten die Zellen in den Messungen ohne Gradient in der oberen Kammer bleiben. Dies wäre bei den Negativkontrollen (-/-) beider Zelllinien sowie bei der Positivkontrolle (+/+) der HT-1080 Versuchsreihe zu erwarten. Wie die gemessenen Zellzahlen in Tabelle 4.1 jedoch zu erkennen geben, hat entgegen den Erwartungen trotz Fehlen eines Gradienten Transmigration stattgefunden. So migrierten im HT-1080 Experiment im Mittel 7,5% der Zellen bei der Positivkontrolle (+/+) und 0,3% bei der Negativkontrolle (-/-) auf die Unterseite der Boyden-Membran; in der Negativkontrolle des HUVEC Experimentes 3,3%. Weiterhin sollte kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle (-/-) und der Positivkontrolle (+/+) zu vermessen sein, da es in beiden Fällen nicht zu einem Konzentrationsgefälle über der Membran kommt. Trotz alledem zeigte sich bei der Positivkontrolle (+/+) mit im Mittel 7527 Zellen eine um das Fünffache erhöhte Zellmigration auf der Unterseite der Membran als bei der Negativkontrolle (-/-) mit im Mittel 301 Zellen (p-Wert 0,0051). Die Ergebnisse zeigen, dass in Gegenwart eines Konzentrationsgefälles signifikant mehr Zellen durch die Membran wandern als ohne Gradient, es aber auch ohne Gradient zu einer aktiven Transmigration kommt. Da die Zellen durch den Versuchsaufbau bestehend aus zwei Kammern der Schwerkraft ausgesetzt werden, könnte dies eine Erklärung dafür sein, warum sowohl in der Positivkontrolle als auch in der Negativkontrolle Zellmigration stattgefunden hat. Die erhöhte Zellmigration, welche bei der Positivkontrolle (+/+) der HT-1080 Versuchsreihe gemessen werden konnte, könnte durch eine erhöhte Zellmotilität ausgelöst durch die höhere Konzentration an Nährmedium erklärt werden. So könnte ungerichtete Zellbewegung statt zielgerichteter Chemotaxis die Ursache für die vermessene Zellmigration in den Referenzmessungen sein (Keller, Borel et al. 1972).

### **5.1.2 Chemotaxis im $\mu$ -Slide**

Anders als die Boyden-Kammer ist das  $\mu$ -Slide derart konzipiert, dass es Lebendzellmikroskopie erlaubt. Die Datenanalyse beruht auf den genauen Bewegungen jeder in die Auswertung aufgenommenen Zelle und liefert neben

Werten wie der Zellgeschwindigkeit eine Vielzahl an Parametern, welche Chemotaxis quantifizieren sollen. Die chemotaktische Wirkung von FCS auf HT-1080 und HUVEC wird im  $\mu$ -Slide-Experiment über die Parameter COM, FMI, Rayleigh-Test, Zellgeschwindigkeit und Direktheit dargestellt. Geht man nun davon aus, dass eine Zellpopulation auf einen Lockstoff mit gezielter Zellmigration antwortet, so lässt sich Chemotaxis im  $\mu$ -Slide durch diejenigen Parameter quantifizieren, die einen signifikanten Unterschied zwischen Lockstoffmessungen und ihren zugehörigen Kontrollmessungen aufweisen können. Diese sollen hier nun im Einzelnen diskutiert werden.

Analysiert man die Ergebnisse beider Zelllinien, so lässt sich kein klarer Zusammenhang zwischen der Direktheit der Migration einer Zelle und der An- oder Abwesenheit eines Lockstoffes erkennen. Dies wird in den nahezu gleich hohen Werten der beiden Referenzmessungen (+/+) und (-/-) der HT-1080 Versuchsreihe verdeutlicht. Während die HT-1080 Versuchsreihe eine Verdoppelung der Direktheit für die Lockstoffmessung (+/-) im Hinblick auf ihre Kontrollmessungen (+/+) und (-/-) aufweist, erzielt sie im HUVEC Experiment nur den geringsten Wert. Demnach scheint die Direktheit kein aussagekräftiges Kriterium für Chemotaxis zu sein. Die Erklärung dafür könnte in den Mikroskopieaufnahmen der Zellen, welche aneinander gereiht als Film abspielbar sind, gefunden werden. Bei Betrachtung der Zellen im Zeitraffer konnte beobachtet werden, dass sich die Zellen in der Lockstoffmessung zwar im Kollektiv in eine Richtung bewegten, sie sich jedoch zum Teil gegenseitig beeinflussten. Migrierte eine Zelle in eine bestimmte Richtung, wurde aber durch eine andere Zelle daran gehindert diese Richtung weiterzuführen, veränderte die ursprüngliche Zelle ihre Laufrichtung oder verharrte zunächst an gegebener Stelle und setzte dann die Migration zu einem späteren Zeitpunkt wieder fort. Die Migrationsverläufe der Lockstoffmessungen in Abbildung 4.7 lassen erkennen, dass vereinzelte Zellen anfangs in entgegengesetzter Richtung des Lockstoffs wandern, dann einen Bogen schlagen und im Anschluss Richtung Lockstoff migrieren. Ein solcher Migrationsverlauf zeigt einerseits "positive" Migration Richtung Lockstoff, wirkt sich jedoch andererseits "negativ" im Sinne der Direktheit aus. Sollte die Direktheit einer Zelle ein Maß für Chemotaxis sein, so kann dies nicht in den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden. Ebenso wurde in der Literatur bislang kein Zusammenhang zwischen der Direktheit einer Zelle und der chemotaktischen Wirkung eines Stoffes beschrieben.

Auch die Zellgeschwindigkeit scheint kein geeignetes Charakteristikum für Chemotaxis zu sein. Bis auf die relativ hohe mittlere Zellgeschwindigkeit der HT-1080 Positivkontrolle (43,2  $\mu\text{m/h}$ ) zeigen die restlichen Messungen beider Zelllinien Werte um 20  $\mu\text{m/h}$ . Obgleich die Zellgeschwindigkeit kein Maß für Chemotaxis darstellt, kann sie dennoch für detaillierte Zellbeobachtungen hinzugezogen werden, da die im  $\mu$ -Slide gemessenen Zellgeschwindigkeiten gänzlich im Rahmen der beschriebenen Literaturangaben liegen. Mit 10-20  $\mu\text{m/h}$  und 30-40  $\mu\text{m/h}$  gehören HUVEC bzw. HT-1080 Zellen im Gegensatz zu Leukozyten, welche sich vergleichsweise mit Geschwindigkeiten bis zu 900  $\mu\text{m/h}$  fortbewegen, zu den langsam migrierenden Zellen (Martin, Mansel et al. 2001, Lefort and Kim 2010, Said, Guilbert et al. 2012).

In Abbildung 4.7 sind die Migrationsverläufe jeder einzelnen Zelle sowie die COM-Werte aller Zellen in ihrer Summe über einen Zeitraum von 24 Stunden dargestellt. Der COM-Wert gibt als Schwerpunkt der Streckenendpunkte aller Zellen eine Richtung an, in welche die Mehrzahl der Zellen migriert ist. Demnach wäre bei Lockstoffmessungen eine Verlagerung des „center of mass“ vom Ursprung zu erwarten. Dies wiederum würde hohe COM-Werte für Lockstoffmessungen sowie kleine Werte für Kontrollmessungen bedeuten. In Abbildung 4.7 liegen bei allen Kontrollmessungen (+/+) und (-/-) die mit einem  $\otimes$ -Symbol markierten COM-Werte nahe am Nullpunkt, während die COM-Werte der Lockstoffmessungen deutliche Abweichungen vom Ursprung anzeigen. Wie in Abbildung 4.6 ersichtlich konnten signifikante Unterschiede im COM-Wert zwischen Lockstoffmessungen und zugehörigen Kontrollen für beide Zelllinien vermessen werden. Im HUVEC Versuch zeigten sich p-Werte von 0,008 und 0,001 für (+/-) bzw. (FaDu/-) in Bezug auf die Negativkontrolle (-/-). Niedrige p-Werte von 0,0006 und 0,0005 für (-/-) bzw. (+/+) in Bezug zur Lockstoffmessung (+/-) konnten im HT-1080 Versuch aufgezeigt werden. Es lässt sich daher abschließend sagen, dass es in Anwesenheit eines Gradienten (+/-) und (FaDu/-) bei HT-1080 sowie HUVEC zu einer deutlichen Verlagerung des „center of mass“ vom Ursprung kommt und somit der COM-Wert klar in Zusammenhang mit vermessener Chemotaxis im  $\mu$ -Slide gebracht werden kann.

Die Tendenz der Zellmigration entlang einer Achse in 2-dimensionaler Umgebung wird durch den „forward migration index“ wiedergegeben. Da sich Zellen bei fehlendem Gradienten ungezielt in alle Richtungen bewegen, werden



gleich hohe FMI-Werte entlang beider Achsen erwartet. Lockstoffmessungen hingegen sollten erhöhte Werte entlang der Achse, welche parallel zum Gradienten ( $FMI^{\parallel}$ ) läuft, aufweisen. Demnach sollten Lockstoffmessungen verhältnismäßig hohe  $FMI^{\parallel}$ -Werte gepaart mit kleinen  $FMI^{\perp}$ -Werten und Kontrollmessungen gleich hohe FMI-Werte entlang x- sowie y-Achse aufzeigen. Im HT-1080 Versuch konnten, wie in Tabelle 4.3 dargestellt, gleich hohe FMI-Werte entlang beider Achsen für Negativ- sowie Positivkontrolle ermittelt werden. Auch in der HUVEC Messung zeigte die Negativkontrolle nahezu gleich hohe Werte ( $FMI^{\parallel} = 0,08$ ;  $FMI^{\perp} = 0,09$ ) für beide Achsen. Die Lockstoffmessungen hingegen zeigten erwartungsgemäß signifikant hohe  $FMI^{\parallel}$ -Werte gepaart mit niedrigen  $FMI^{\perp}$ -Werten. Daraus ergibt sich, dass sich Chemotaxis gut durch den forward migration index definieren lässt. Allerdings sollte der forward migration index immer gepaart (Vergleich von  $FMI^{\parallel}$  und  $FMI^{\perp}$  einer Messung oder Vergleich von  $FMI^{\parallel}_{\text{Kontrolle}}$  und  $FMI^{\parallel}_{\text{Lockstoff}}$ ) betrachtet werden.

In der Mathematik kann die statistische Verteilung von Punkten in einem Kreis unter anderem mit Hilfe des Rayleigh-Tests ermittelt werden (Mardia 1972). In anderen Worten besagt der Rayleigh-Test wie wahrscheinlich es ist, dass Punkte um einen Ursprung oder in einem Kreis inhomogen oder homogen verteilt sind. Bereits Zicha *et al.* verwendete den Rayleigh-Test um eine signifikante unimodale Verteilung von Zellen in der Dunn-Kammer, welche er mit Chemotaxis gleichsetzte, darzustellen (Zicha and Dunn 1995). Wendet man den Rayleigh-Test auf die Migrationsverläufe (Abbildung 4.7) des  $\mu$ -Slides an, werden die Streckenendpunkte der Zellen nach einer Zeitspanne von 24 Stunden darauf getestet, ob sie in ihrer Gesamtheit gleichmäßig oder ungleichmäßig um den Nullpunkt angeordnet sind. Demnach weisen p-Werte des Rayleigh-Tests  $< 0,05$  ein inhomogenes Verteilungsmuster der Streckenendpunkten und p-Werte  $\geq 0,05$  ein homogenes auf. In Folge dessen müssten sich Zellen innerhalb einer Zellpopulation in Abwesenheit eines Lockstoffes gleichmäßig in alle Richtungen bewegen, während der Zusatz eines Lockstoffes die Zellen in eine Richtung migrieren lässt und damit ein inhomogenes Verteilungsmuster von Zellen hervorruft. Abbildung 4.7 A, C und D zeigt die Migrationsverläufe von HT-1080 und HUVEC nach 24 Stunden ohne ein Konzentrationsgefälle. Die Zellen sind hier gleichmäßig in alle Richtungen um den Nullpunkt verteilt. Dies wird durch

relativ hohe p-Werte des Rayleigh-Tests in allen Kontrollmessungen beider Zelllinien bestätigt. Wie in Tabelle 4.2 ersichtlich liegen die mittleren p-Werte des Rayleigh-Tests für die HT-1080 Versuchsreihe mit 0,59 (-/-) und 0,73 (+/+) und für die HUVEC Versuchsreihe mit 0,18 (+/+) deutlich über 0,05 (siehe auch Abbildung 4.6). Dahingegen deuten die p-Werte aller Lockstoffmessungen mit  $6,44 \cdot 10^{-6}$  (+/-) der HT-1080 Versuchsreihe und  $6,85 \cdot 10^{-5}$  (+/-) und 0,0011 (FaDu/-) der HUVEC Versuchsreihe sowie auch die Migrationsverläufe in Abbildung 4.7 B, E und F auf eine inhomogene Zellverteilung. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich Chemotaxis im  $\mu$ -Slide nicht nur bildlich sondern auch mathematisch im Rayleigh-Test ausdrücken lässt.

Insofern stellen die Parameter COM, FMI und p-Wert des Rayleigh-Testes ein gutes Maß für die Charakterisierung von Chemotaxis dar, während Zellgeschwindigkeit, Direktheit und Videomikroskopie zusätzliche Informationen über Zellverhalten und -motilität liefern.

### **5.1.3 Boyden-Kammer- und $\mu$ -Slide-Ergebnisse im Vergleich**

Ogleich sich beide Systeme grundsätzlich von einander unterscheiden, so können zumindest ihre Endergebnisse miteinander verglichen werden. Die Experimente mit beiden Zelllinien zeigen signifikante Unterschiede in der Zellmigration zwischen Lockstoffmessungen (+/-) und Negativkontrollen (-/-) an. Erhöhte Zellmigration in Anwesenheit eines Gradienten kann somit in beiden Systemen festgestellt werden. Während sich die Ergebnisse der Boyden-Kammer lediglich auf einen Wert, die Zellzahlen der verschiedenen Messungen (Lockstoff- und Kontrollmessungen) beschränkt, können im  $\mu$ -Slide mehrere verschiedene Parameter (FMI, COM, Rayleigh, Zellgeschwindigkeit) herangezogen werden. Hinzu kommt, dass sich in der Boyden-Kammer durch die fehlende Möglichkeit zur Zellbeobachtung reine Chemokinese nicht von Chemotaxis unterscheiden lässt. So fanden seit Erfindung der Boyden-Kammer nicht nur Modifikationen des Testverfahrens an sich statt, es wurde auch nach Rechenansätzen, welche den Ausschluss von Chemokinese ermöglichen, gesucht. So wurden in der Literatur verschiedene Ansätze beschrieben, mit

denen sich die Unterscheidung von zufälliger Migration und gerichteter Chemotaxis, berechnen lässt. Unter anderem beschreibt Zigmond *et al.* in seiner Arbeit Berechnungen mit denen sich grob die Distanz, welche Zellen erwartungsgemäß in dicken Filtern in Abwesenheit von Chemotaxis zurücklegen, schätzen lässt (Zigmond and Hirsch 1973). Büttner *et al.* wiederum schließt unter Verwendung zweier Parameter, den sogenannten "random motility coefficient,  $\mu$ " und "chemotaxis coefficient,  $\chi$ ", auf eine intrinsische Zellbewegung, welche sich unabhängig von äußeren physikalischen Einflüssen verhält (Büttner, Lauffenburger *et al.* 1989). Eingehende Berechnungen erfordern wiederum zusätzliche Versuchsansätze unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen und gestalten den anfangs einfachen Versuchsaufbau der Boyden-Kammer komplexer.

Des Weiteren fällt auf, dass sich die Ergebnisse der Referenzmessungen (-/-) und (+/+) des HT-1080 Versuchs in der Boyden-Kammer von denen im  $\mu$ -Slide unterscheiden. Während Zellmigration der Positivkontrolle (+/+) im HT-1080 Versuch durch die Boyden-Membran erhöht stattfindet, zeigt sie im  $\mu$ -Slide keinen Unterschied zur Negativkontrolle. Im Boyden-Kammer-Versuch zeigt sich sogar ein signifikanter Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle mit einem p-Wert von 0,0035, obwohl in beiden Fällen kein Konzentrationsgefälle auf die Zellen wirkt. Zellmigration der Positivkontrolle im  $\mu$ -Slide kann bei Betrachtung des Migrationsverlaufs in Abbildung 4.7 C vermessen werden, doch ist diese nicht als gerichtet zu bewerten. Die erhöhte Zellmigration durch die Boyden-Membran in Abwesenheit eines Gradienten ist daher eher durch eine erhöhte Zellmotilität im Sinne einer chemokinetischen (weniger einer chemotaktischen) Zellreaktion zu erklären. Auch kann im  $\mu$ -Slide, in welchem sich die Zellen in einer Ebene bewegen, die Schwerkraft außer Betracht gelassen werden, welche in der Boyden-Kammer, bei der sich die Zellen von oben nach unten bewegen, definitiv eine Rolle spielt.

Obwohl sich die Grundbedingungen der (FaDu/-) Messungen in der Boyden-Kammer und im  $\mu$ -Slide sehr voneinander unterscheiden, kann für beide Messungen ein signifikanter Unterschied zu ihren jeweiligen Negativkontrollen gezeigt werden. In beiden Experimenten konnte gezeigt werden, dass Hypopharynx-Karzinomzellen in der Lage sind Faktoren zu produzieren, welche chemotaktisch auf Endothelzellen wirken.

## 5.2 Vor- und Nachteile beider Systeme

Rückblickend auf die in der Einleitung beschriebene Entwicklung Chemotaxis-messender Systeme können die Kriterien, die ein gutes Testverfahren ausmachen, gesetzt werden. Dabei haben sich in Bezug auf ein Chemotaxis-messendes Verfahren vier Kriterien besonders hervorgehoben:

- einfacher Versuchsaufbau
- Möglichkeit der Zellbeobachtung
- stabiler Konzentrationsgradient
- Reproduzierbarkeit

Boyden-Kammer und  $\mu$ -Slide sollen nun im Hinblick auf diese Kriterien verglichen werden.

Der Hauptvorteil der Boyden-Kammer liegt offensichtlich im einfachen Versuchsaufbau. Das Prinzip und die Versuchsanweisungen sind leicht verständlich und anwenderfreundlich. Unter Einbeziehung der Zellauszählung liegt die durchschnittliche Versuchsdauer bei ca. 8 Stunden, der Nettoarbeitsaufwand nach Abzug der nötigen Inkubationszeit sogar nur bei 1-2 Stunden. Dies ermöglicht eine simultane Durchführung vieler Versuchsansätze. Allerdings stellt die Zählung der migrierten Zellen eine Fehlerquelle dar. Dies kommt zum einen durch die oben genannten ungenauen Randbereiche zustande. Des Weiteren erwies sich das Wegwischen der Zellen mit einem Wattestäbchen auf der Oberseite der Membran als problematisch, da unter anderem Zellen, welche sich in den Poren befanden, ebenfalls weggewischt wurden. Die Interpretation der Ergebnisse stellt sich wiederum unkompliziert dar. Während sich im Boyden-Versuch lediglich endliche Zellzahlen von Lockstoff- und Referenzmessungen gegenüber stehen, ist die Interpretation der  $\mu$ -Slide Ergebnisse aufwendiger. Zum Beispiel sind die beiden FMI-Werte (parallel und senkrecht zum Gradienten) nur in Beziehung zueinander aussagekräftig.

Dahingegen liegt der Nachteil des  $\mu$ -Slides in jedem Fall in der Aufwendigkeit des Experiments. Das Einbringen der Zellen in den Beobachtungskanal erfordert Übung. Detaillierte Protokollanweisungen (genaue Stöpselpositionen und Füllreihenfolge) müssen exakt befolgt werden. Auf die richtige

Pipettiergeschwindigkeit muss geachtet werden. Zu schnelles Befüllen des Beobachtungskanals oder der Reservoirs kann zum Austreten der Zellen aus dem Kanal oder zum Auftreten von Luftblasen im System führen. Sogar das Aufsetzen der Stöpsel muss exakt und behutsam durchgeführt werden. Auch hier kann es zu Luftblasenbildung oder Zellaustritt kommen, beachtet man zum Beispiel nicht den genauen Füllzustand der Kamme vor Aufsetzen der Stöpsel. Lange Videomikroskopie- (24 h) und Zell-Adhärenz-Zeiten (2-4 h) führen zu einer Gesamtversuchsdauer von durchschnittlich 30 Stunden. Teures Equipment und technisches Verständnis (Videomikroskopie, Software-gesteuerter Tisch, Heiz- und Inkubationssystem) sind Voraussetzung für die Durchführung des  $\mu$ -Slide-Experiments.

Genannte Vorzüge machen die Boyden-Kammer zu einer der meist genutzten Methoden für Chemotaxisversuche. Trotz allem sind die gewonnenen Informationen aus einem Boyden-Kammer-Versuch aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Zellbeobachtung während des Migrationsvorganges begrenzt. Eine Analyse von Morphologie, Geschwindigkeit oder Verhalten der Zellen ist mit dieser Methode nicht möglich. Auch kann zielgerichtete Chemotaxis nicht von ungerichteter Chemokinesis unterschieden werden (Wei, Parker et al. 2003). Des Weiteren nehmen diverse Störfaktoren Einfluss auf die gemessene Zellantwort. Beispielsweise hängt das Ausmaß der Zellmigration nicht nur von Zellmotilität, sondern auch von Zellgröße, Zellverformung oder der initialen Zellposition zur Pore ab. Kleine und leicht verformbare Zellen passieren die Membran effizienter als große, weniger verformbare Zellen. Porenahe Zellen überwinden die Membran leichter als porenferne Zellen. Dies könnte die oft beobachtete inhomogene Zellverteilung auf der Membran erklären. Da die Zellen von oben nach unten migrieren spielt des Weiteren die Schwerkraft eine Rolle. Außerdem können bereits migrierte Zellen von der Membran fallen und entgehen dabei der finalen Zellzählung (Keller, Borel et al. 1972). Um dem vorzubeugen wurden Methoden beschrieben, bei denen die Zellen, welche in die untere Kammer gefallen sind, mitgezählt werden (Jungi 1975, Campbell, Qin et al. 1996).

Im Gegensatz zur Boyden-Kammer, welche eine direkte Zellbeobachtung nicht ermöglicht, liegt das Prinzip des  $\mu$ -Slides in der Lebendzellmikroskopie begründet. Die glasähnliche Qualität der Kammer macht das  $\mu$ -Slide für inverse Mikroskopie geeignet und ermöglicht eine hervorragende Visualisierung der

Zellen. Zellen können über die Bestimmung von Morphologie und Geschwindigkeit eingehend charakterisiert werden. Mit Hilfe einer Software bietet das  $\mu$ -Slide eine Vielzahl an Parametern, die zur Chemotaxisbeurteilung herangezogen werden können. Dies ermöglicht unter anderem eine Unterscheidung zwischen gerichteter Chemotaxis und zufälliger Zellbewegung.

Einer der bedeutendsten Nachteile der Boyden-Kammer liegt jedoch im Konzentrationsgradienten. Dieser ist nur von kurzer Dauer, instabil und schlecht definierbar (Lauffenburger and Zigmond 1981). Dabei können die Kraft und die Geschwindigkeit mit der man das Zellkultur-Insert in die Loch-Platte setzt einen Einfluss auf den Konzentrationsgradienten nehmen. Da sich der Konzentrationsgradient über Diffusion durch die Poren der Boyden-Membran aufbaut, beeinflussen auch die Zellen selbst, welche während der Transmigration die jeweiligen Poren verstopfen, den Konzentrationsgradienten.

Im Gegensatz dazu ist der Konzentrationsgradient im  $\mu$ -Slide stabil, gut definierbar und hält bis zu 24 Stunden an (Zengel, Nguyen-Hoang et al. 2011).

Parallel durchgeführte Experimente mit HT-1080 und HUVEC zeigen für beide Testverfahren deutlich und reproduzierbar, dass die Zellen Richtung Lockstoff migrieren und somit Chemotaxis mit beiden Verfahren, Boyden-Kammer sowie  $\mu$ -Slide, gemessen werden kann.

Fazit dieser Arbeit: Die Boyden-Kammer besticht durch simplen und anwenderfreundlichen Versuchsaufbau, ist jedoch in ihrer Aussagekraft bezüglich Chemotaxismessungen deutlich eingeschränkt. Umfangreiche und zeitaufwendige Versuchsdurchführungen im  $\mu$ -Slides werden durch gut reproduzierbare und aussagekräftige Resultate belohnt.

Daher empfiehlt es sich vor der Wahl für ein geeignetes Testverfahren zuerst die Anforderungen, die an ein Experiment gestellt werden, zu prüfen. Stellt sich lediglich die Frage, ob und wie stark eine Substanz chemotaktisch auf eine Zellpopulation wirkt, ist die Boyden-Kammer in jedem Fall das bestgeeignete Testverfahren. Sind genauestes Zellverhalten bei stabilen Konzentrationsgradienten von Interesse, unterliegt die Boyden-Kammer klar dem  $\mu$ -Slide.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Chemotaxis, zielgerichtete Zellmigration auf einen Lockstoff, koordiniert unter anderem die Bekämpfung einer Infektion durch das Immunsystem und spielt eine entscheidende Rolle bei der Verbreitung und Versorgung maligner Tumore. Seit über einem Jahrhundert suchen Forscher nach geeigneten Testverfahren zur Messung von Chemotaxis. Dabei unterliegen alle dem gemeinsamen Prinzip, der Beobachtung verstärkter Zellmigration in Anwesenheit eines Lockstoffes. Während manche Assays Chemotaxis über den Vergleich von Zellpositionen vor und nach Zusatz eines Lockstoffes quantifizieren, erlauben andere eine direkte Zellbeobachtung während der Migration. Die größte Schwierigkeit stellt jedoch die Bereitstellung und Aufrechterhaltung eines stabilen und definierbaren Gradienten. Die 1962 entwickelte Boyden-Kammer etablierte sich als Testverfahren zum Goldstandard für Chemotaxisversuche.

In dieser Arbeit wurden Durchführbarkeit und Ergebnisse der Boyden-Kammer in direkten Vergleich zu einem neuwertigem Testsystem, dem  $\mu$ -Slide Chemotaxis der Firma Ibidi, gebracht. Dabei konnten Vor- und Nachteile beider Systeme herausgearbeitet werden.

Die Boyden-Kammer ist im Hinblick auf einen einfachen und anwenderfreundlichen Versuchsaufbau gegenüber dem  $\mu$ -Slide sowie den meisten Chemotaxis-messenden Testverfahren deutlich im Vorteil. Jedoch ist weder eine Zellbeobachtung während der Migration möglich noch kann ein stabiler Gradient aufgebaut werden.

Dahingegen bietet das  $\mu$ -Slide einen stabilen, andauernden Gradienten und ermöglicht eine hervorragende direkte Zellbeobachtung mit reproduzierbaren Parametern zur Quantifizierung von Chemotaxis. Das  $\mu$ -Slide Chemotaxis ist für die Identifikation neuer Lockstoffe und die Austestung des Potenzials Chemotaxis-inhibierender Substanzen geeignet. Doch könnten aufwendiger Versuchsaufbau und größerer Zeitaufwand einer weitläufigen Verbreitung im Wege stehen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Becker, E. L. (1977). "Stimulated neutrophil locomotion: chemokinesis and chemotaxis." Archives of pathology & laboratory medicine **101**(10): 509-513.

Bikfalvi, A. (2007). "[Tumor angiogenesis]." Bull Cancer **94**(7 Suppl): F193-198.

Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." J Exp Med **115**: 453-466.

Buettner, H. M., et al. (1989). "Measurement of leukocyte motility and chemotaxis parameters with the Millipore filter assay." Journal of immunological methods **123**(1): 25-37.

Campbell, J. J., et al. (1996). "Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells." The Journal of cell biology **134**(1): 255-266.

Campbell, P. B. (1977). "An improved method for the in vitro evaluation of monocyte leukotaxis." J Lab Clin Med **90**(2): 381-388.

Chenoweth, D. E., et al. (1979). "A modified method for chemotaxis under agarose." J Immunol Methods **25**(4): 337-353.

Clark, E. R. and E. L. Clark (1920). American Journal of Anatomy **27**: 221.

Clark, E. R. and E. L. Clark (1922). Anat. Rec. **24**: 137.

Comandon, J. (1917). Compt. rend. Soc. de Biol. **80**: 314.

Cornely, H. P. (1966). "Reversal of chemotaxis in vitro and chemotactic activity of leukocyte fractions." Proc Soc Exp Biol Med **122**(3): 831-835.

Crank, J. (1964). The Mathematics of Diffusion. Oxford, Clarendon Press.

Cussler, E. L. (1997). Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems. New York, Cambridge University Press.

Cutler, J. E. and J. J. Munoz (1974). "A simple in vitro method for studies on chemotaxis." Proc Soc Exp Biol Med **147**(2): 471-474.

Falk, W., et al. (1980). "A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration." J Immunol Methods **33**(3): 239-247.



- Fidler, I. J. and L. M. Ellis (1994). "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis." Cell **79**(2): 185-188.
- Fisher, N. I. (1993). Statistical analysis of circular data. Cambridge England ; New York, NY, USA, Cambridge University Press.
- Folkman, J. (1986). "How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture." Cancer Res **46**(2): 467-473.
- Folkman, J. (1990). "What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?" J Natl Cancer Inst **82**(1): 4-6.
- Folkman, J. (1992). "The role of angiogenesis in tumor growth." Semin Cancer Biol **3**(2): 65-71.
- Foxman, E. F., et al. (1997). "Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis." J Cell Biol **139**(5): 1349-1360.
- Foxman, E. F., et al. (1999). "Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation." The Journal of cell biology **147**(3): 577-588.
- Gostner, J. M., et al. (2011). "Effects of EpCAM overexpression on human breast cancer cell lines." BMC Cancer **11**: 45.
- Grimes, G. J. and F. S. Barnes (1973). "A technique for studying chemotaxis of leucocytes in well-defined chemotactic fields." Exp Cell Res **79**(2): 375-385.
- Gundersen, R. W. and J. N. Barrett (1979). "Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor." Science **206**(4422): 1079-1080.
- Jungi, T. W. (1975). "Assay of chemotaxis by a reversible Boyden chamber eliminating cell detachment." Int Arch Allergy Appl Immunol **48**(3): 341-352.
- Keller, H. U. (1966). "Studies on chemotaxis. 3. Modification of Boyden's technique for the evaluation of chemotactic agents." Immunology **10**(3): 225-230.
- Keller, H. U., et al. (1972). "Re-assessment of Boyden's technique for measuring chemotaxis." Journal of immunological methods **1**(2): 165-168.
- Keller, H. U. and E. Sorkin (1968). "Chemotaxis of leucocytes." Experientia **24**(7): 641-652.
- Lalla, R. V., et al. (2003). "Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma." Archives of otolaryngology--head & neck surgery **129**(8): 882-888.
- Lauffenburger, D. A. and S. H. Zigmond (1981). "Chemotactic factor concentration gradients in chemotaxis assay systems." Journal of immunological methods **40**(1): 45-60.

Leber, T. (1888). "Über die Entstehung der Entzündung und die Wirkung der entzündungserregenden Schädlichkeiten." Fortschritt der Medizin **6**: 460-464.

Leber, T. (1891). "Die Entstehung der Entzündung."

Lefort, C. T. and M. Kim (2010). "Human T lymphocyte isolation, culture and analysis of migration in vitro." Journal of visualized experiments : JoVE(40).

Mardia, K. V. (1972). Statistics of directional data. London, New York,, Academic Press.

Martin, T. A., et al. (2001). "Hepatocyte growth factor modulates vascular endothelial-cadherin expression in human endothelial cells." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **7**(3): 734-737.

Navenot, J. M., et al. (2009). "KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis." Molecular pharmacology **75**(5): 1074-1083.

Norman, M. U. and P. Kubes (2005). "Therapeutic intervention in inflammatory diseases: a time and place for anti-adhesion therapy." Microcirculation **12**(1): 91-98.

Olson, T. S. and K. Ley (2002). "Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology **283**(1): R7-28.

Pfoehl, J. (1898). Zentralbibliothek für Bakterien **24**: 343.

Phelps, P. (1969). "Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro. 3. Possible release of a chemotactic substance after phagocytosis of urate crystals by polymorphonuclear leukocytes." Arthritis and rheumatism **12**(3): 197-204.

Ratajczak, H. V., et al. (1986). "Increased chemotaxis of leukocytes from mice bearing tumors." Cancer Res **46**(5): 2225-2229.

Reinmuth, N., et al. (2003). "Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract." Microsc Res Tech **60**(2): 199-207.

Ruchlädew, N. (1910). Zeitschrift für Biologie **54**: 533.

Said, G., et al. (2012). "Impact of carbamylation and glycation of collagen type I on migration of HT1080 human fibrosarcoma cells." International journal of oncology **40**(6): 1797-1804.

Tempel, T. R., et al. (1970). "Factors from saliva and oral bacteria, chemotactic for polymorphonuclear leukocytes: their possible role in gingival inflammation." J Periodontol **41**(2): 71-80.

Valerius, N. H. (1978). "In vitro effect of colchicine on neutrophil granulocyte locomotion. Assessment of the effect of colchicine on chemotaxis, chemokinesis and spontaneous motility, using a modified reversible Boyden chamber." Acta Pathol Microbiol Scand B **86B**(3): 149-154.

Ward, P. A., et al. (1965). "The Role of Serum Complement in Chemotaxis of Leukocytes in Vitro." J Exp Med **122**: 327-346.

Wei, S. H., et al. (2003). "A stochastic view of lymphocyte motility and trafficking within the lymph node." Immunological reviews **195**: 136-159.

Wilkinson, P. C. (1974). Chemotaxis and inflammation, Edinburgh, Churchill Livingstone.

Zeller, P. J., et al. (2001). "In vivo chemotactic properties and spatial expression of PDGF in developing mesenteric microvascular networks." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **280**(5): H2116-2125.

Zengel, P., et al. (2011). "mu-Slide Chemotaxis: a new chamber for long-term chemotaxis studies." BMC cell biology **12**(1): 21.

Zicha, D., et al. (1997). "Analyzing chemotaxis using the Dunn direct-viewing chamber." Methods Mol Biol **75**: 449-457.

Zicha, D. and G. A. Dunn (1995). "Are growth factors chemotactic agents?" Experimental cell research **221**(2): 526-529.

Zicha, D., et al. (1991). "A new direct-viewing chemotaxis chamber." J Cell Sci **99** (Pt 4): 769-775.

Zigmond, S. H. (1977). "Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors." J Cell Biol **75**(2 Pt 1): 606-616.

Zigmond, S. H. and J. G. Hirsch (1973). "Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor." The Journal of experimental medicine **137**(2): 387-410.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	drei-dimensional
AEG	Aktiengesellschaft
AG	Arbeitsgemeinschaft
ATCC	American Type Culture Collection
bFGF	basic fibroblast growth factor
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
ca.	zirka
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COM	Center of mass
D	Directness
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECGM	Endothel Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
et al.	et alia
FaDu	Hypopharynx-Karzinomzelllinie
FCS	Fetal calf serum
FMI	Forward migration index
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HT-1080	Fibrosarkomzelllinie
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
i.e.	id est
JPEG	Joint Photographic Expert Group
KLSM	Konfokales Laserscan Mikroskop
max.	maximal
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
PBS	Phosphat buffered saline
PMMA	Polymethylmethacrylat
Tiff	Tagged image file format
U	Unit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
$\mu$	My
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ m	Micrometer

# DANKSAGUNG

*An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:*

*Herrn Prof. Dr. Olivier Gires für die Vergabe des Themas, die kritische Durchsicht dieser Arbeit, die siebenjahrelange Geduld und die vielen expressiven E-mails. Danke Olivier.*

*Frau Dr. Pamela Zengel für die nette, oft spätabendliche Betreuung, auch nach langen Kliniktagen und die Möglichkeit von Sphäroiden auf Chemotaxis umzusatteln.*

*Ibidi GmbH für die großzügige Versorgung mit  $\mu$ -Slides und die Möglichkeit das Supermikroskop benutzen zu können.*

*Ganz herzlich möchte ich mich bei Elias Horn bedanken für die selbstlose, immer hilfsbereite Betreuung bei den  $\mu$ -Slide Versuchen, Deine immer charmante und witzige Art und natürlich für die Möglichkeit bei Team ibidi mitzukicken.*

*Herrn Prof. Dr. Stefan Zahler für die oft sehr spontanen HUVEC-Spenden.*

*Piri Mack für Dein immer offenes Ohr bei Schwierigkeiten jeglicher Art.*

*Meinem Bruder, der immer so stolz auf mich ist, für die monatlichen Finanzspritzen als ich noch ein armer Student war. Danke Bruderherz.*

*Meiner Mama, die mir schon von klein auf beigebracht hat, dass man alles schaffen kann - danke für Deine Unterstützung bei einfach allem! Egal ob Studium, Arbeit oder Bebie.*

*Und zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann für das Ertragen meiner Launen, für Deine Unterstützung bei dieser Arbeit und Deine unermüdlichen Tritte in den Allerwertesten bedanken. Danke Herr Schreyer.*

## Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anna-Chi Schreyer, erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Charakterisierung des  $\mu$ -Slides zur Analyse von Chemotaxis:  
Ein Vergleich zur Boyden-Kammer

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Anna-Chi Schreyer